

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Sinusoidaler Glutathionexport der Leber -
Regulation eines endogenen antioxidativen Schutzsystems
durch aktivierte Kupffer Zellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Carolin Melcher
aus
Lübeck
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Manfred Bilzer

Mitberichterstatter: PD Dr. Florian Löhe

Prof. Dr. Michael Fischereeder

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2010

**Meiner Familie
und allen,
die an mich geglaubt haben**

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 BEDEUTUNG UND BILDUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	1
1.2 ANTIOXIDATIVE SCHUTZMECHANISMEN	3
1.3 GSH-EXPORT IN DIE SINUSOIDE ALS WICHTIGER EXTRAZELLULÄRER ANTIOXIDATIVER SCHUTZMECHANISMUS	6
1.4 GSH- TRANSPORTER	9
1.4.1 MULTIDRUG RESISTANCE PROTEINE (MRP).....	10
1.4.2 ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDE (OATP)	12
1.5 REGULATION DES GSH-TRANSPORTES.....	13
1.6 MORPHOLOGIE DER LEBER.....	13
1.7 DIE ROLLE DER KUPFFERZELLEN ALS PRODUZENTEN VERSCHIEDENER ZYTOKINE UND PARAKRINER HORMONE	16
1.8 BILDUNG VON EIKOSANOIDEN	19
1.9 STEATOSIS HEPATIS	22
2. FRAGESTELLUNG	23
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 EXPERIMENTELLE MODELLE UND VERSUCHSPROTOKOLL	24
3.1.1 RATTENLEBER – PERFUSION	24
3.1.2 AKTIVIERUNG KUPFFER´SCHER STERNZELLEN.....	26
3.1.3 HEMMUNG DES CYCLOOXYGENASE-WEGES	27
3.1.4 PERFUSION DER LEBER MIT PROSTAGLANDINEN	29
3.1.5 UNTERSUCHUNG DES LIPOXYGENASE-WEGES.....	29
3.1.6 PERFUSION DER LEBER MIT LTC ₄	31
3.1.7 GLUTATHION- FREISETZUNG VERFETTETER LEBERN	31
3.2 BESTIMMUNGEN	32
3.2.1 PORTALER DRUCK PERFUNDIERTER RATTENLEBERN	32
3.2.2 GALLEFLUß	32
3.2.3 SINUSOIDALER LACTAT-DEHYDROGENASE (LDH)-EFFLUX.....	32
3.2.4 BESTIMMUNG VON THROMBOXAN B ₂ UND PROSTAGLANDIN F _{2α}	33
3.2.5 GESAMT-GLUTATHION IN GALLE UND LEBERPERFUSAT	33
3.2.6 GLUTATHIONDISULFID (GSSG) IN GALLE UND LEBERPERFUSAT	34
3.2.7 GLUTATHION (GSH) IN GALLE UND LEBERPERFUSAT	35
3.2.8 GESAMT- GLUTATHION IM LEBERGEWEBE	35
3.2.9 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES LEBERGEWEBES	35
3.3 STATISTIK	36

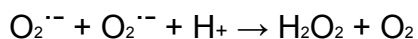
3.4	MATERIALIEN	36
3.4.1	CHEMIKALIEN	36
3.4.2	REZEPTORAGONISTEN UND ANTAGONISTEN	37
3.4.3	ENZYME	37
3.4.4	ENZYM- INHIBITOREN UND AKTIVATOREN	37
3.4.5	GASE.....	38
3.4.6	RIA UND ELISA KITS.....	38
3.4.7	VERBRAUCHSMATERIALIEN	38
3.4.8	PUFFERLÖSUNGEN	38
4.	ERGEBNISSE.....	39
4.1	PERFUSION UNBEHANDELTEN LEBERN	39
4.2	STIMULATION DER SINUSOIDALEN GSH-AUSSCHIEDUNG NACH AKTIVIERUNG KUPFFER'SCHER STERNZELLEN DURCH ZYMOSE	40
4.3	DIE ROLLE VON PROSTAGLANDINEN BEI DER STIMULATION DER HEPATISCHEN GSH- AUSSCHIEDUNG NACH KS- AKTIVIERUNG	47
4.3.1	GESTEIGERTE BILDUNG VON PROSTAGLANDINEN DURCH AKTIVIERTE KS.....	47
4.3.2	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER GESTEIGERTEN PROSTAGLANDIN- BILDUNG DURCH AKTIVIERTE KS	50
4.3.3	STIMULATION DES HEPATISCHEN GLUTATHION- EXPORTES DURCH INFUSION VON PROSTAGLANDINEN	58
4.4	BETEILIGUNG VON LEUKOTRIENEN BEI DER STIMULATION DER HEPATISCHEN GSH- AUSSCHIEDUNG NACH KS- AKTIVIERUNG	63
4.5	GESTÖRTE SINUSOIDALE GSH- AUSSCHIEDUNG IN FETTLBERN HOMOZYGOTER ZUCKER- RATTEN	69
5.	DISKUSSION	77
5.1	STIMULATION DES SINUSOIDALEN GLUTATHION- EFFLUX DURCH AKTIVIERTE KUPFFER- ZELLEN	78
5.2	MECHANISMEN DER ZELL-ZELL-INTERAKTION ZWISCHEN KUPFFER ZELLEN UND HEPATOZYTEN	79
5.2.1	BEDEUTUNG VON CYCLOOXYGENASE-I.....	79
5.2.2	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER PROSTAGLANDINE	81
5.2.3	BETEILIGUNG VON LEUKOTRIENEN.....	83
5.2.4	GESTÖRTER GSH-TRANSPORT IN FETTLBERN.....	85
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87

7. LITERATURVERZEICHNIS.....	91
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	105
9. TABELLENVERZEICHNIS	108

Einleitung

1.1 Bedeutung und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Bereits unter physiologischen Bedingungen werden in Gegenwart von Sauerstoff reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) von nahezu allen Zellen des Körpers gebildet. Oxidasen wie die Aminosäure- oder Xanthin-Oxidase sowie der Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette übertragen Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Dabei entsteht das *Superoxidanion-Radikal* ($O_2^{\cdot-}$), das spontan oder enzymatisch durch die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert wird und zu *Wasserstoffperoxid* (H_2O_2) dismutiert (Fridovich 1975):



Trotz ihrer relativ schwachen oxidierenden Eigenschaften besitzen $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 eine zentrale Rolle bei der Entstehung oxidativer Zellschäden. Sie dienen als wichtige Vorstufe toxischer Radikale und Oxidantien und bilden außerdem unter Anwesenheit von Fe^{2+} - und Cu- Ionen äußerst reaktive und zytotoxische Hydroxylradikale (HO^{\cdot}) (Yu 1994). So wird z. B. bei Entzündungsreaktionen von Granulozyten und Makrophagen das *Stickstoffmonoxid-Radikal* ($\cdot NO$) freigesetzt, welches selbst keine toxischen Eigenschaften besitzt, allerdings durch Reaktion mit $O_2^{\cdot-}$ toxische Peroxynitrit-Anionen bildet (Beckmann 1990; Inoue 1995).

Zu den radikalischen ROS zählen das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), das Peroxylradikal (RO_2^{\cdot}), das Alkoxy-Radikal (RO^{\cdot}) sowie das Hydroxyperoxyl-Radikal (HO_2^{\cdot}). Nichtradikalische ROS sind Wasserstoffperoxid, hypohalide Säure, Ozon und Peroxynitrit.

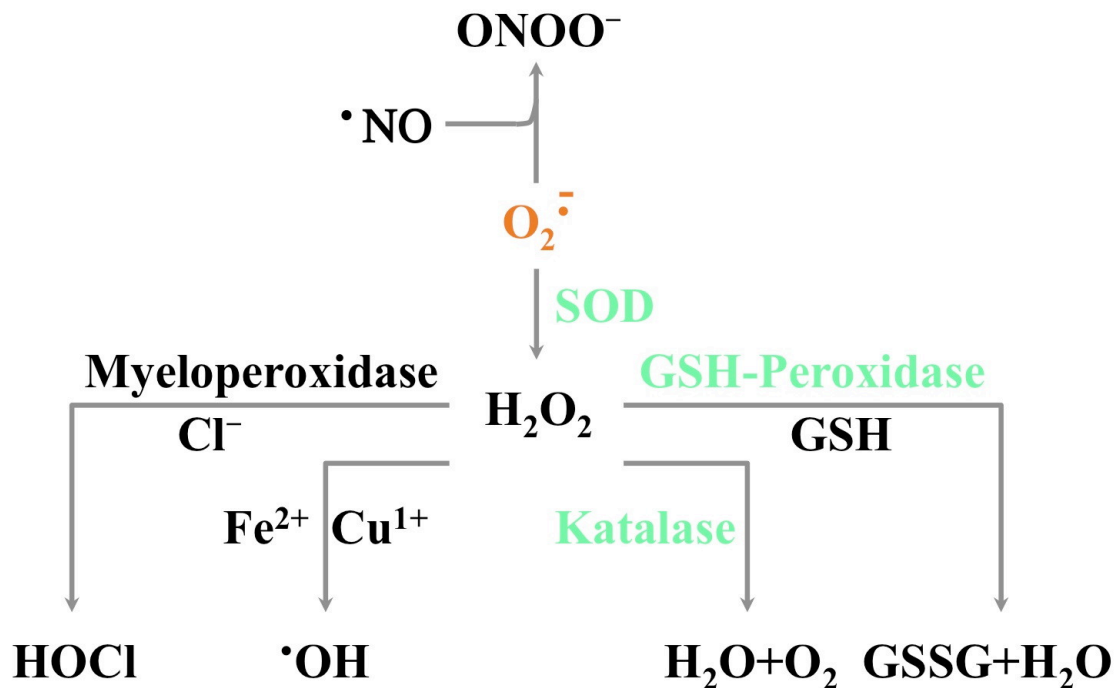


Abbildung 1 : Die Bildung zytotoxischer Oxidantien aus $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 .

Toxische Oxidantien entstehen aus dem wenig reaktiven Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das z.B. von aktivierten Makrophagen sezerniert wird. $O_2^{\cdot-}$ dismutiert spontan oder katalysiert durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 . Dessen Reaktivität ist ebenfalls gering, jedoch kann es in Anwesenheit von Fe^{2+} mit $O_2^{\cdot-}$ zu toxischen Hydroxyl-Radikalen ($OH\cdot$) reagieren und wird im Zellstoffwechsel durch die Glutathion-Peroxidase oder Katalase reduziert. Desweiteren bildet H_2O_2 durch die Myeloperoxidase-katalysierte Reaktion mit Haliden (z.B. Cl^-) hypohalide Säuren (z.B. $HOCl$), die mit Aminen zu toxischen Chloraminen reagieren können. Die Bildung von Hydroxyl-Radikalen und Myeloperoxidase-Produkten ist damit von der $O_2^{\cdot-}$ - und H_2O_2 -Bildungsrate, der Anwesenheit von Fe^{2+} und der Aktivität $O_2^{\cdot-}$ - und H_2O_2 -abbauender Enzyme abhängig. Dargestellt ist außerdem die Reaktion von $O_2^{\cdot-}$ mit $\cdot NO$, das eine ähnlich geringe Toxizität wie $O_2^{\cdot-}$ besitzt. Die bei dieser Reaktion entstehenden Peroxynitrit-Anionen besitzen eine erheblich höhere Toxizität als $O_2^{\cdot-}$ und $\cdot NO$.

Oxidative Zellschäden entstehen dann, wenn die Bildung der Oxidantien die antioxidative Kapazität überschreitet.

Reaktive Sauerstoffspezies können an nahezu allen Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten strukturelle Änderungen bewirken und dadurch deren biologische Funktion verändern (Janssen 1993). Durch die Möglichkeit der Schädigung sehr verschiedener Moleküle in verschiedener Ausprägung und Kombination ergibt sich ein buntes Bild biochemischer Läsionen und ihrer Konsequenzen.

Dabei ist der Bildungsort der reaktiven Sauerstoffradikale für die Art und Auswirkung der Schädigung entscheidend, da die sehr reaktiven und kurzlebigen Sauerstoffintermediate nur in unmittelbarer Nähe ihres Entstehungsortes wirksam sind (Fee 1977). Membranschäden entstehen so z.B. durch die Reaktion von O_2^- -Radikalen mit Membranlipiden. Bei der Interaktion von reaktiven Sauerstoffspezies mit Proteinen wiederum ist die Beeinflussung von Enzymaktivitäten durch Oxidation von SH-Gruppen von Bedeutung.

Da die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale eine Begleiterscheinung des Lebens unter aeroben Bedingungen und für viele physiologische Prozesse (z.B. die unspezifische Infektabwehr durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen und Granulozyten) erforderlich ist, andererseits aber zu Gewebsschädigung führen kann, sind Schutzmechanismen bei überschießender Produktion von Nöten.

1.2 Antioxidative Schutzmechanismen

Zellen sind sowohl in ROS-bildenden, als auch in ROS-exponierten Kompartimenten mit äußerst wirksamen antioxidativen Schutzmechanismen ausgestattet (**Tabelle 1**). Wie bereits erläutert, sind potentiell toxische ROS als Folgeprodukte von O_2^- und H_2O_2 anzusehen, weshalb ein effizientes *primäres antioxidatives Schutzsystem* zur Entgiftung von O_2^- und H_2O_2 von existentieller Wichtigkeit ist.

Hierzu zählen neben dem Enzym *Superoxid-Dismutase* (SOD), das durch Beschleunigung der $O_2^{\cdot-}$ -Umwandlung zu H_2O_2 die Bildung von Peroxynitrit vermindert, die Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase und GSH.

Der Abbau von H_2O_2 ist durch die Enzyme *Katalase* und *Glutathion-Peroxidase* sogar doppelt abgesichert (Yu 1994). Darüber hinaus wird die Zelle durch verschiedene *sekundäre Antioxidantien* geschützt (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Primärer und sekundärer oxidativer Schutz der Zelle.

Antioxidantien	Lokalisation	Mechanismus
Primär		
SOD	Zytosol, Mitochondrien	$O_2^{\cdot-}$ - Dismutation
Katalase	Peroxisomen	H_2O_2 – Reduktion
GSH-Peroxidase	Zytosol, Mitochondrien	H_2O_2 – Reduktion
GSH	Zytosol, Mitochondrien	Substrat der GSH-Peroxidase
Sekundär		
GSSG-Reduktase	Zytosol	GSSG-Reduktion zu GSH
Thioredoxin	Zytosol	Protein-Reduktion
Vitamin C	Zytosol	Reduktion von S-S-Bindungen
Vitamin E	Membranen	Reaktion mit Lipid-Peroxy- Radikalen
Bilirubin	Zytosol	Reaktion mit Lipid-Peroxy- Radikalen

Ausführliche Beschreibung im Text.

Diese sekundären Antioxidantien können z.B. eine bereits ablaufende Radikalkettenreaktionen unterbrechen (Vitamin E, Bilirubin), den reduzierten Zustand primärer Antioxidantien wie Glutathion erhalten (Glutathion-Reduktase, Vitamin C) sowie oxidierte Proteine reduzieren (Thioredoxin-System).

Im Vergleich zum Intrazellulärraum besitzen extrazelluläre Matrix und Blut ein wesentlich geringeres antioxidatives Potential (Halliwell 1986). Im Plasma existieren vor allem indirekte Schutzmechanismen durch Eisen- und Kupfer-bindende Proteine wie z.B. Albumin, Transferrin und Coeruloplasmin (**Tabelle 2**).

Unter den in Tabelle 2 aufgeführten Antioxidantien des Extrazellulärtraumes besitzt reduziertes Glutathion (GSH) wahrscheinlich die größte Bedeutung, wofür zunächst allein schon die chemischen Besonderheiten von GSH sprechen. Während andere Antioxidantien eine strenge ROS-Spezifität auszeichnet (**Tabelle 1 und 2**), kann GSH mit nahezu allen ROS eine spontane chemische Reaktion eingehen.

Tabelle 2: Extrazelluläre Antioxidantien

Antioxidantien	Antioxidativer Mechanismus
Albumin	Fe – Bindung, Reaktion mit $\cdot\text{OH}$
Transferrin	Fe – Bindung
Coeruloplasmin	Fe^{2+} - Oxidation, Cu - Bindung
GSH	Nicht-enzymatische Reduktion von H_2O_2 , HOCl^\ominus und Peroxynitrit
Harnsäure	Fe- und Cu – Bindung
Vitamin C	Reduktion von S-S-Bindungen
Vitamin E	Reaktion mit Lipid-Peroxy- Radikalen
Bilirubin	Reaktion mit Lipid-Peroxy- Radikalen

(aus „Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies in der Pathologie des Ischämie-Reperfusionsschadens“ Bilzer et al. 2004)

Die Reduktion von H_2O_2 , HOCl^\ominus und ONOO^\ominus wird dabei als besonders wichtig erachtet (Bilzer 1991, Liu 1994, Knight 2002).

Ferner zeigten funktionelle Untersuchungen in Sepsis- Modellen eine enge Korrelation zwischen oxidativen Gewebeschäden durch aktivierte Makrophagen bzw. Granulozyten und dem Plasma- GSH-Gehalt (Jaeschke 1994, Liu 1994).

Die extrazelluläre Konzentration des GSH ist mit 5-10 μM im Vergleich zur intrazellulären Konzentration (2000-10000 μM) sehr gering und kann deshalb nur bedingt vor extrazellulär generierten ROS schützen.

Letztlich erklärt das geringe antioxidative Potential des Extrazellulärtraumes Gewebeschäden durch aktivierte Granulozyten und Makrophagen bei Entzündungen. Andererseits sind für die physiologischen Funktionen dieser Zellen, wie z.B. die Destruktion von Bakterien und Tumorzellen, ROS erforderlich.

ROS können mit nahezu allen Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen und Fetten reagieren und hierdurch eingreifende strukturelle und funktionelle Veränderungen bewirken (Janssen 1993).

1.3 GSH-Export in die Sinusoide als wichtiger extrazellulärer antioxidativer Schutzmechanismus

Glutathion (γ -Glutamyl-cysteinyl-glycin) ist ein Tripeptid, das im Stoffwechsel der Zellen eine herausragende Rolle spielt und in hoher Konzentration vorhanden ist. Es ist in einen Redoxkreislauf eingebunden, in dem es in oxidierter (GSSG) und in reduzierter Form (GSH) vorliegt (Kaplowitz 1985). In diesem Redoxsystem wird die Reduktion von GSSG zu GSH durch die Glutathion-Reduktase katalysiert, wobei das Gleichgewicht stark zugunsten des reduzierten Glutathion verschoben und NADPH als Cofaktor notwendig ist. Das Verhältnis von oxidierter zu reduzierter Form bestimmt das Redoxpotential des umgebenden Milieus und damit auch die Funktion von Enzymen. Neben seiner Wirkung als Radikalfänger hat das Redoxsystem Glutathion (GSH/GSSG) noch zahlreiche Schlüsselfunktionen bei biochemischen Prozessen inne (Sies und Summer 1975, Anundi 1979, Samuelson 1983, Meister 1984).

So spielt es eine wichtige Rolle:

- a) bei der Leukotrienbiosynthese
- b) bei der Deaktivierung toxischer, elektrophiler Agentien mit Disulfidbrücken
- c) als Coenzym verschiedener anderer Enzyme
- d) beim Abbau von Peroxiden und anderen Oxidantien
- e) als Steuermolekül der Mitose und aller Reparaturgene
- f) für die Synthese von DNA-Vorstufen

Zu schweren pathophysiologischen Konsequenzen kann es demnach kommen, wenn eine zu große Anzahl von Oxidantien die Kapazität des Glutathion - Metabolismus übersteigt und hieraus oxidativer Stress resultiert. Die dabei nicht entgifteten Oxidantien können Strukturproteine, Enzyme, Membranlipide und Nukleinsäuren angreifen und somit entscheidend die Zellfunktion beeinträchtigen.

Im Lebergewebe findet sich Glutathion unter physiologischen Bedingungen vorwiegend in reduzierter Form im Verhältnis GSH:GSSG = 250:1 (Kaplowitz 1985). Bei einer Halbwertszeit von 3-5 Stunden in den Hepatozyten der Ratte (Orrenius 1983) wird intrazelluläres GSH von Hepatozyten in reduzierter Form in den Sinusoidalraum und in oxidiert Form (GSSG) biliär exportiert (Lauterburg und Smith 1986). Unter Sauerstoffmangel wird allerdings zudem auch ein zusätzlicher sinusoidaler Efflux von GSSG beobachtet (Sies und Akerboom 1984). Eine bestimmte basale Menge Glutathion verlässt ständig die Leberzelle und tritt in das Blutplasma über (Anderson und Meister 1980). Die Rate dieser Freisetzung in das Plasma ist dabei von der GSH- Konzentration in der Leberzelle abhängig (Ookthens 1985). Steigt der intrazelluläre GSH-Gehalt an, so erreicht die sinusoidale Freisetzung einen Sättigungsgrad; fallen die Werte ab, geht auch der Efflux in das Blutplasma zurück.

Aufgrund dieser und weiterer Untersuchungen kam Kaplowitz (1985) zu der Auffassung, dass es sich bei der sinusoidalen Freisetzung von GSH um einen Carrier- vermittelten Transport handelt.

Die hierdurch entstehende GSH- Plasmakonzentration ist im Vergleich zur intrazellulären Konzentration allerdings sehr niedrig und liegt speziesabhängig bei 5-15 μM (Jaeschke 1988, Michelet 1995).

GSSG verlässt die Leberzelle über die Sinusoide in noch sehr viel geringeren Mengen, Bartoli konnte die Freisetzung von GSSG bezogen auf GSH in einer 10-fach geringeren Menge nachweisen (Bartoli und Sies 1978).

GSSG wird in großen Mengen aus der Leberzelle kanalikulär in die Galle abgegeben, so dass es in der Galle in 10 bis 20-fach höherer Konzentration erscheint als in der Leberzelle (Lauterburg 1984). Hierbei konnte eine direkte Proportionalität der Konzentrationen zwischen beiden Kompartimenten nachgewiesen werden (Akerboom 1982, Lauterburg 1982) (**Abb.2**).

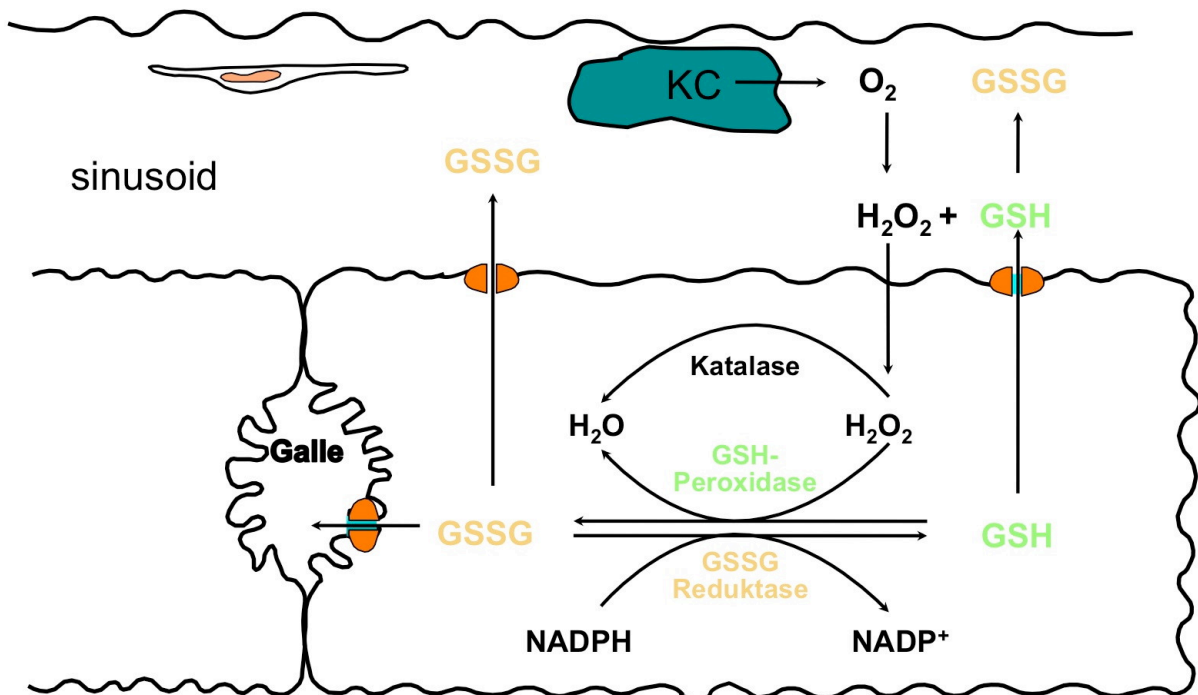


Abbildung 2 : Bildung und Entgiftung von ROS in der Leber. Detaillierte Beschreibung im Text.

1.4 GSH- Transporter

Die Leber spielt eine Schlüsselrolle in der Versorgung anderer Organe mit Glutathion und setzt GSH am sinusoidalen Pol in das Blut sowie am canalikulären Pol in die Galle frei. Dieser Efflux erscheint an beiden Polen durch einen low-affinity Carrier-vermittelt zu sein (Kaplowitz 1985, Fernandez-Checa 1992, Garcia-Ruiz 1992).

Besonderheiten des Transports an beiden Polen des Hepatozyten führten zu der Auffassung, dass zwei verschiedene Transportsysteme existieren müssen.

Trotz zahlreicher Vorarbeiten zum GSH-Transport wurden die verantwortlichen Transportproteine bislang erst teilweise identifiziert.

In Studien der letzten Jahre konnte allerdings gezeigt werden, dass sowohl Vertreter der Multidrug resistance-associated protein- Familie (MRP/CFTR bzw. ABCC) (Keppler 1996,1997 und 1998, König 1999, Leier 1996) als auch der Organic anion transporting polypeptide- Familie (OATP bzw. SLC21A) an diesem Prozess beteiligt sind (Ballatori 1998, 2004 und 2005, Li 1998, 2000) (**Abb. 3**).

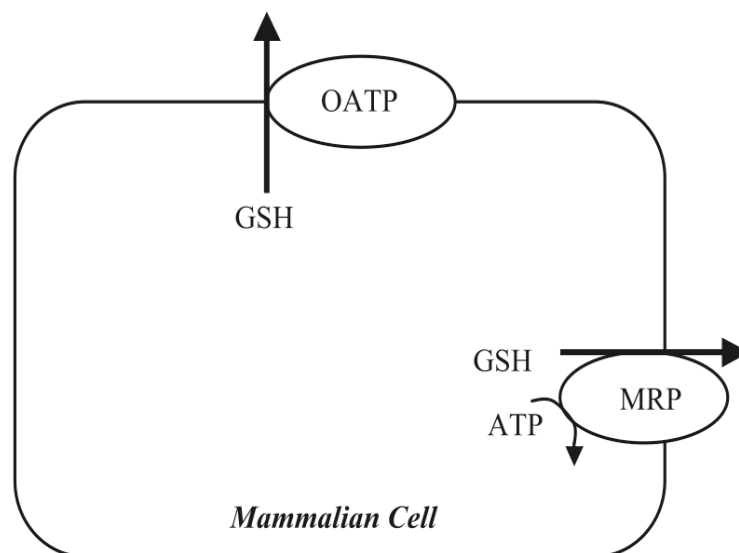


Abbildung 3: GSH-Transport/Proteine in Säugetierzellen.

Säugetierzellen exportieren GSH über Transportproteine der OATP- und MRP-Familien (modifiziert nach Ballatori „Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins“).

1.4.1 Multidrug Resistance Proteine (MRP)

Die MRP/CFTR-Proteine entstammen der Familie C der ABC-Superfamilie (ABCC). Diese Familie besteht aus insgesamt neun MRP-Genen (MRP1-9), wobei besonders MRP 1, 2 und 3 eine Rolle für den GSH-Transport spielen.

Die MRP-Proteine bestehen alle, wie es für die ABC-Superfamilie üblich ist, aus zwei Domänen (MSD 1 und 2), die die Zellmembran überspannen. Die Domänen selbst sind jeweils aus sechs transmembranösen α -Helices zusammengesetzt.

Man vermutet, dass die Bindung von Substraten durch Interaktionen an eben diesen Helices entsteht. Zusätzlich existieren zwei weitere Nucleotid-binding Domänen an der zytosolischen Seite des Proteins (**Abb. 4**).

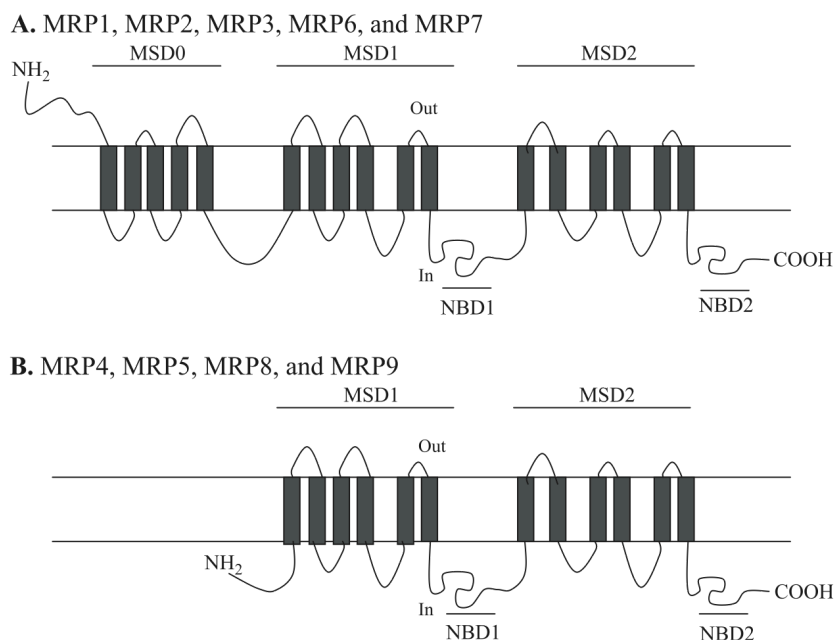


Abbildung 4: Die vermutete Struktur der MRP-Proteine

(A) MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 und MRP7 enthalten, zusätzlich zu den zwei bekannten Helices der Domänen MSD1 und 2, eine zusätzliche Membranen überspannende Domäne, die aus fünf transmembranösen Helices (MSD 0) sowie zwei Nucleotid-bindende Domänen NBD1 und 2 bestehen.

(B) MRP4, MRP5 und MRP8 enthalten MSD1 und MSD2 sowie NBD1 und NBD2.

(modifiziert nach Ballatori „Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins“).

MRP1

MRP1 ist ein ubiquitär in fast allen Zellen des Organismus vorhandenes Protein (Flens 1996). Es wird vermutet, dass es als GSH-Transporter fungiert, wobei die genaue Interaktion zwischen Glutathion und dem MRP1-Komplex trotz intensiver Untersuchungen der letzten Jahre (Marchan 2008) noch nicht endgültig geklärt ist.

GSH scheint :

- a. selbst ein low-affinity Substrat für MRP1 zu sein
- b. für den Co-Transport bestimmter MRP1-Substrate notwendig zu sein
- c. den Transport bestimmter Verbindungen über die Membran zu stimulieren, ohne diese selbst zu passieren.
- d. die Transportrate von Verbindungen wie Vincristin, Etoposid, Daunorubicin oder Doxorubicin zu erhöhen.

Hierbei scheint wiederum die Grösse und Ausrichtung der Bindungsstelle entscheidend zu sein, ob GSH selbst gebunden und transportiert werden kann.

MRP2

MRP2 ist in 48% der Aminosäuren mit MRP1 identisch und damit in der Lage diverse der oben bereits genannten Substrate wie GSH und Glutathion-S-Konjugate zu transportieren (Paulusma 1999). MRP2 ist allerdings überwiegend nur in der Leber sowie in geringeren Mengen in der Niere und im Duodenum vorhanden. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass GSH an MRP2 ähnlich wie an MRP1 sowohl Co-Transport-Mechanismen stimuliert als auch die ATPase-Aktivität von MRP2 erhöht (Keppler 1997 und 1998, König 1999).

MRP2 ist in der kanalikulären Membran der Leberzelle lokalisiert und für den Export von GSSG und GSH-S- Konjugaten verantwortlich. Eine mögliche Beteiligung am biliären GSH-Transport wird jedoch noch kontrovers diskutiert (Ballatori 2005).

MRP3

MRP3 ist in 58% der Aminosäuren mit MRP1 identisch und, obwohl nicht so ubiquitär vorhanden wie MRP1, doch weitgehend exprimiert. Besonders hohe Aktivitäten der RNA-Transkripte finden sich in der Leber, wo sie als Glutathion-S-Konjugat-Transporter charakterisiert wurden.

Es wird jedoch angenommen, dass GSH selbst nicht von MRP3 transportiert wird, MRP3 aber in den entero-hepatischen Kreislauf der Gallensalze eingebunden ist.

MRP4 und MRP5

MRP4 und MRP5 fehlt die dritte Membran-überspannende Domäne, was darauf hindeutet, dass sie eine andere Funktion haben, als die übrigen Mitglieder der MRP-Familie. Während die Expression der RNA in den meisten Geweben des Körpers eher rudimentär ist, konnte MRP4 vor einigen Jahren in der basolateralen Membran humaner und Ratten-Hepatozyten sowie HepG2-Zellen nachgewiesen werden und stellt somit diesen Zellen einen alternativen Transportmechanismus für GSH und Gallensalze zur Verfügung (Rius 2003). Zudem transportieren beide Proteine cAMP und cGMP, in welchem Rahmen ein GSH-abhängiger Transport diskutiert wird.

Dagegen ist die Bedeutung von MRP6, MRP7, MRP8 und MRP9 für den Transport von GSH bis zum heutigen Tag unbekannt, da Funktion, Lokalisation und Regulation noch nicht hinreichend untersucht sind.

1.4.2 Organic anion transporting polypeptide (OATP)

Aus der weitläufigen Gruppe der OATP-Proteine sind bisher 2 Transporter bekannt, die Glutathion als Substrat akzeptieren und transportieren. Namentlich sind dies ratOATP 1 und ratOATP 2. Gezeigt werden konnte zudem, dass neben dem bestehenden elektrischen Gradienten die ratOATP 1- gesteuerte Substrat-Aufnahme hauptsächlich durch den auswärts gerichteten Glutathion-Efflux getriggert wird.

Die menschlichen Orthologe der OATP-Proteine müssen allerdings noch identifiziert werden.

1.5 Regulation des GSH-Transportes

Verschiedene Arbeiten konnten unlängst eine gesteigerte oder verminderte Expression der Transportproteine MRP und OATP unter unterschiedlichen pathophysiologischen Bedingungen nachweisen (Geier 2005). Dieser Weg der Regulation des GSH-Transportes benötigt in aller Regel mehrere Stunden bis Tage und ist von zahlreichen Faktoren wie zum Beispiel Synthese und Degradation von Transportproteinen abhängig. Unklar sind dagegen noch die Mechanismen der schnellen Stimulation der sinusoidalen GSH-Freisetzung unter Stressbedingungen wie Ischämie-Reperfusion oder Endotoxin-Exposition (Jaeschke 1991, Jaeschke 1992). Gerade dieser Mechanismus erscheint jedoch wichtig, da er Organe durch die unmittelbare Bereitstellung von GSH gegen oxidativen Stress schützt. Bislang konnte am Modelle der perfundierten Rattenleber sowie an Zellkulturen eine Stimulation der sinusoidalen GSH-Freisetzung durch direkte Zufuhr von Katecholaminen und Cysteinyl-Leukotrienen nachgewiesen werden (Sies und Graf 1985, Bilzer 1993). Die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung blieb jedoch unklar.

1.6 Morphologie der Leber

Die Leber ist das bedeutendste Stoffwechselorgan des Körpers. Sie wird durch zwei, in ihrer Hämodynamik sehr unterschiedliche Gefäßsysteme mit Blut versorgt: Das Niederdruck- oder Pfortadersystem stellt mit etwa drei Viertel den Hauptanteil des Blutflusses und führt als funktionelles Gefäß sauerstoffarmes, aber nährstoffreiches Blut. Im Gegensatz dazu trägt das arterielle Hochdrucksystem mit der A. hepatica, die als nutritives Gefäß sauerstoffreiches Blut führt, nur etwa ein Viertel zur Zirkulation bei.

Gemeinsame Endstrecke beider Systeme sind die Lebersinusoiden, in denen die Aufnahme toxischer Substanzen aus dem Blutstrom bzw. die Abgabe wichtiger Verbindungen wie Glutathion und Gerinnungsfaktoren erfolgt.

Unter den nicht-parenchymalen Zellen der Leber werden *Sinusendothel-Zellen*, *Kupffer-Zellen* und *Ito-Zellen* zusammengefasst, die sich überwiegend in der Wand der Lebersinusoiden befinden (**Abb. 5**).

Das Leberparenchym wird dagegen allein von der Gesamtheit der *Hepatozyten* gebildet. Alle diese Zellen sind in unterschiedlich hoher Anzahl vorhanden und erfüllen unterschiedliche Funktionen.

So enthalten die *Hepatozyten* viele Mitochondrien vom Christa-Typ, Lysosomen und Peroxisomen, sowie viel glattes und rauhes Endoplasmatisches Retikulum (ER). Sie entnehmen die der Leber zugeführten Proteine, Fette und Kohlenhydrate und verstoffwechseln sie. Als Sekret geben sie die Galle ab.

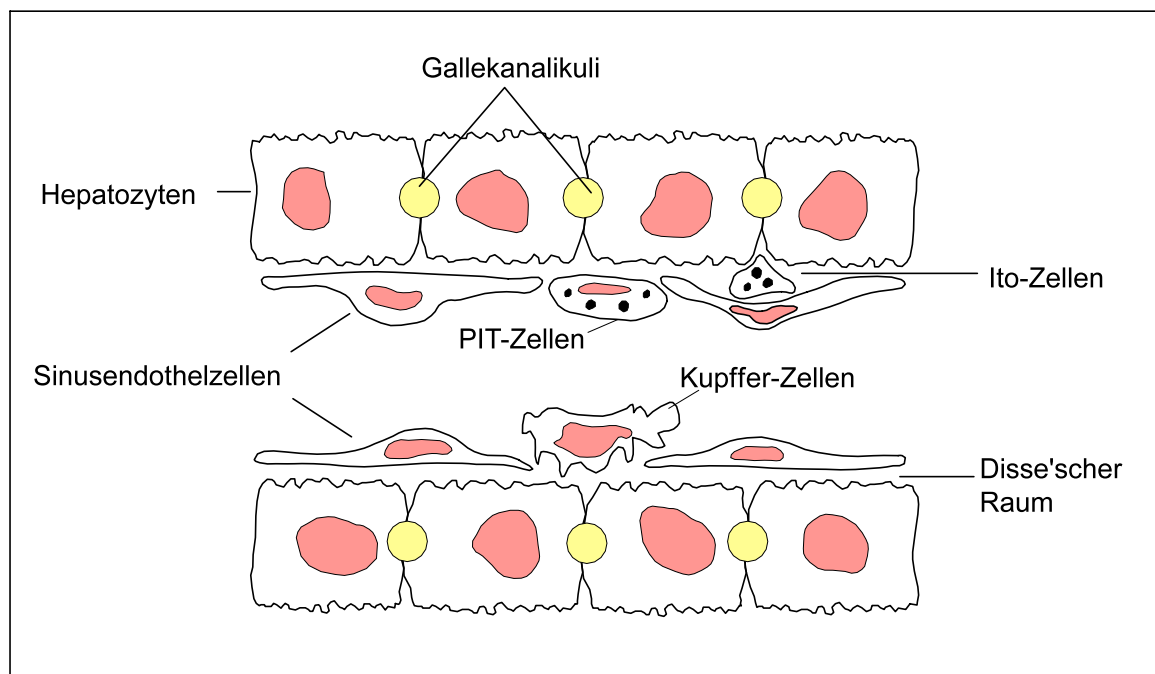


Abbildung 5 : Zellulärer Aufbau des Leberparenchyms (modifiziert nach Decker 1990). Detaillierte Beschreibung im Text.

Die Endothelzellen (EC), auch Uferzellen genannt, bilden die Auskleidung der Sinusoide und verbinden sich wegen ihrer verzweigten Form nur unter Bildung von Poren, weshalb man die Lebersinusoide auch als Kapillaren vom gefensterten Typ bezeichnet. Diese Fenestrierungen enthalten dynamische Strukturen, deren Durchmesser von Blutdruck, vasoaktiven Substanzen, Medikamenten und Giften abhängt (Fraser 1980/Mc Cuskey 1983) und so in unterschiedlichem Ausmaß den Durchtritt von Makromolekülen ermöglichen. Eine Vielzahl pathophysiologischer Zustände, wie z.B. Infektionen oder Ischämie/Reperfusion kann die Integrität der EC stören und so u. a. zu einer Aktivierung der Gerinnung und Thrombosebildung führen (Vollmar 1994).

Die *Kupffer'schen Sternzellen (KC, Kupffer-Zellen)* liegen zwischen den Endothelzellen und erreichen mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern, den Pseudopodien, den Disse'schen Raum und die Leberparenchymzellen. Es handelt sich um modifizierte Monozyten, die zu den Makrophagen zählen und zum RES (Retikulo-endotheliales System) gerechnet werden. Kupfer-Zellen sind amöboid beweglich und können sich so aus dem Endothelverband lösen. Ihre Aufgabe ist es, Viren, Bakterien, Pilze (Thornton 1996) Immunkomplexe, Endotoxine der gramnegativen Erreger (Decker 1990, Su 2002, Fabrick 2005) und Zelltrümmer, aber auch Tumorzellen aus dem von der V. portae kommenden Blut zu phagozytieren (Mc Cuskey 1984). Neben der Fähigkeit zur Phagozytose haben KC einen entscheidenden Anteil an der Bildung und Freisetzung vasoaktiver, insbesondere vasokonstriktiver Substanzen wie Prostaglandinen und Leukotrienen, die den sinusoidalen Blutfluß regulieren (Nolan 1981). Darüber hinaus produzieren aktivierte KC neben freien Sauerstoffradikalen (ROS) weitere pro-inflammatorische Mediatoren wie Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6), Eicosanoide und „platelet activating factor“ (PAF) (Decker 1990, Laskin 1990, Wanner 1996, Bilzer 2005).

1.7 Die Rolle der Kupferzellen als Produzenten verschiedener Zytokine und parakriner Hormone

Aufgrund ihrer Morphologie und Funktion gehören die Kupfer'schen Sternzellen zum mononukleären Phagozytensystem. Dabei machen sie 80% der im Körper vorhandenen Makrophagen aus (Klein 1994). Morphologisch handelt es sich bei den Kupfer-Zellen um große, irregulär geformte Zellen, die durch die Bildung von Protrusionen, Einstülpungen und fadenförmigen Fortsätzen sehr form-variabel sind. Sie sind zwischen den Sinusendothelzellen lokalisiert, ragen weit in das Zellumen vor und schaffen durch ihre Fortsätze eine Kommunikation mit den Sinusendothelzellen und Hepatozyten (**Abb.6**).

Sie stellen die erste Makrophagenpopulation dar, die mit Bakterien, bakteriellen Endotoxinen und weiteren bakteriellen Bestandteilen aus dem gastrointestinalen Trakt in Kontakt kommt (Fox 1987) und besitzen, wie alle Zellen des mononukleären Phagozytosesystems die wichtige Aufgabe der Phagozytose und Antigenpräsentation.

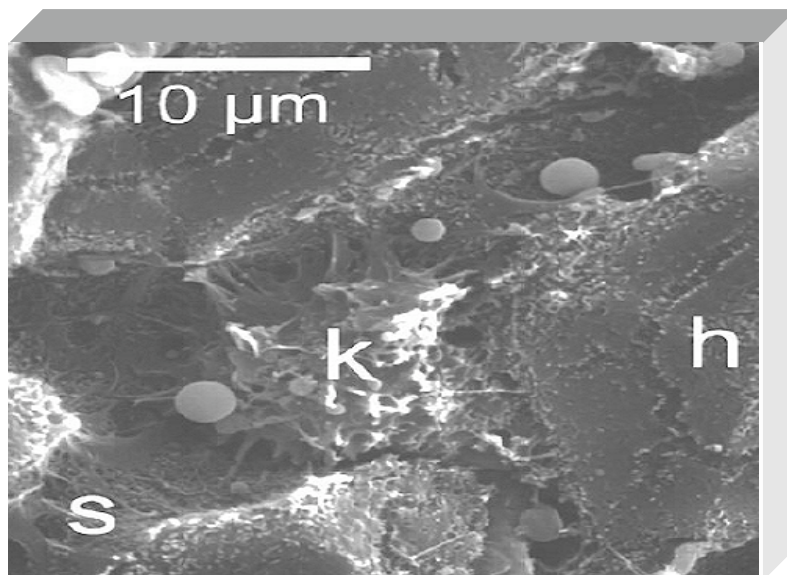


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Darstellung einer Kupfer'schen Sternzelle (k) in einem Lebersinusoid (s) in enger Nachbarschaft zu Hepatozyten (aus Bilzer et al 2005).

Die rasche Entfernung der Bakterien (-bestandteile) wurde lange Zeit den KS alleine zugeschrieben (Klein 1994). Neue experimentelle Erkenntnisse zeigen jedoch die komplexe Kooperation von KS und neutrophilen Granulozyten (Suematsu 2000, Kappas 2004, Ryter 2006).

Die meisten der in die Leber transportierten Mikroorganismen adhären in einem ersten Schritt an KS (Ofek 1997, Shimazu 1999, Akira 2001, Gregory 2002). Anschliessend vermitteln komplementäre Adhäsionsmoleküle (z.B. CD11b/CD18 und CD 54) die Anheftung der neutrophilen Granulozyten an KS (Perry 1984, Van Oosten 1995).

Dann werden die an KS gebundenen Mikroorganismen durch Granulozyten phagozytiert. Im letzten Schritt erfolgt die Terminierung der Entzündung durch Phagozytose der neutrophilen Granulozyten durch KS (Shi 1996, Brown 2001). Sowohl phagozytierbare als auch lösliche Substanzen sind in der Lage, KS zu aktivieren.

Die wichtigsten KS-Aktivatoren sind die Komplement-Faktoren C3a und C5a (Schieferdecker 1999 und 2001), β -Glucane von Bakterien und Pilzen (Thornton 1996) sowie die Endotoxine der Gram-negativen Erreger (Decker 1990, Su 2002, Fabrick 2005). Die mit der Adhäsion von Mikroorganismen einhergehende Aktivierung der KS erfolgt durch eine komplexe Interaktion mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren. Bekannt ist die direkte Aktivierung des Toll-like 4 Rezeptors durch LPS (Su 2002), wodurch vor allem die NF κ B- abhängige Transkription proinflammatorischer Gene induziert wird. Darüber hinaus ist eine indirekte Aktivierung der KS durch Endotoxin bekannt.

Hierbei ist, wie in **Abbildung 7** beschrieben, die Aktivierung von Komplement durch Endotoxin mit nachfolgender Bildung der Komplementfaktoren C3a und C5a beteiligt (Jaeschke 1994). Beide Faktoren sind ausgesprochen starke KS-Aktivatoren, deren Wirkung auf der Stimulation G-Protein-gekoppelter C3a und C5a-Rezeptoren beruht (Ember 1997, Schieferdecker 1999 und 2001).

Die hierdurch aktivierte Phospholipase C führt über die Bildung von Inositol-3-Phosphat sowohl zur Erhöhung der Aktivität der Proteinkinase C (PKC) als auch zur Calcium-Mobilisation aus dem endoplasmatischen Retikulum und dem extrazellulären Raum über den Weg der Öffnung von L-Typ Calciumkanälen, wodurch die zytosolischen Ca-Konzentration erhöht und im nächsten Schritt die Phospholipase A₂ stimuliert wird (Decker 1990). Die dabei gebildete Arachidonsäure steht dann für die Bildung von Eikosanoiden zur Verfügung.

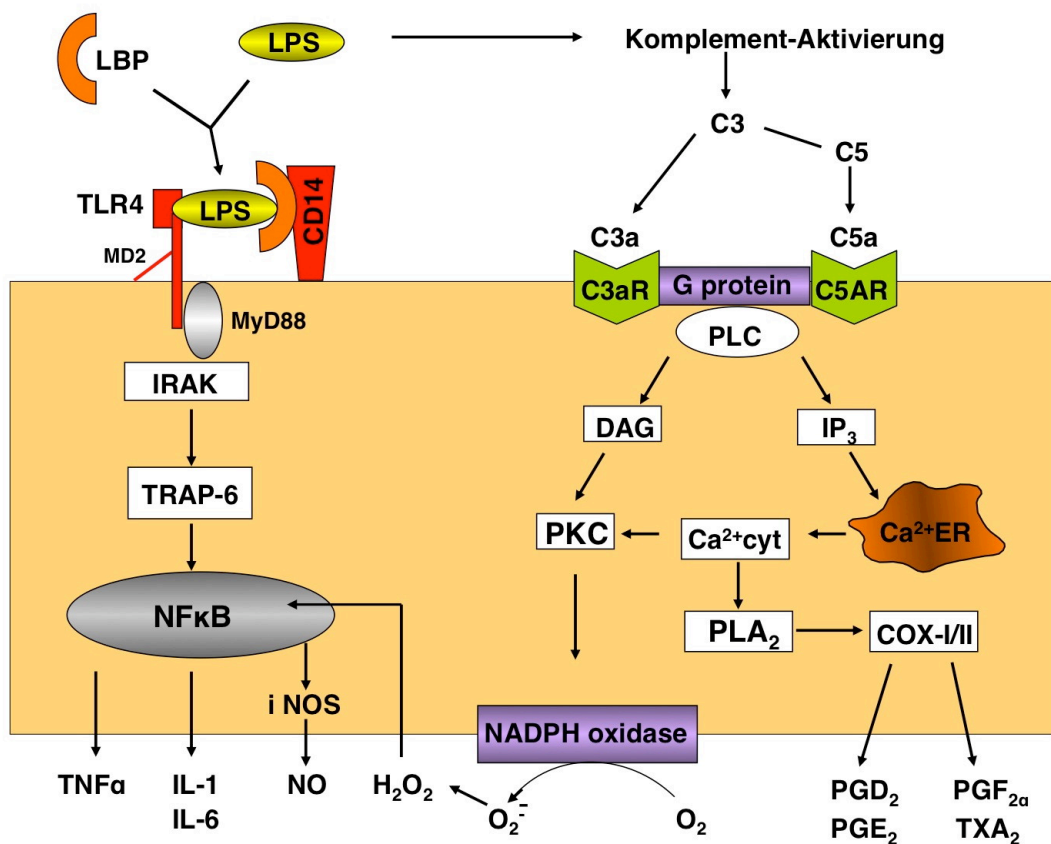


Abbildung 7: Aktivierung von Kupfer-Zellen durch Stimulation von Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Komplement-Rezeptoren. Detaillierte Beschreibung im Text.

Der Komplement-Rezeptor-abhängige Weg der KS Aktivierung kann darüber hinaus durch die β -Glucane der Zellwände von Mikroorganismen aktiviert werden (Thornton 1996).

Ein klassischer und in Tierexperimenten häufig verwendeter KS-Aktivator ist Zymosan, eine β -Glucan-reiche Zellwandfraktion der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Untersuchungen an kultivierten KS zeigten eine massive Zunahme der Eikosanoid-Bildung durch Zymosan (Decker 1990). Vermehrt gebildet werden hierbei sowohl die vasokonstriktorisches Prostanoid PGF_{2 α} , TXA₂ und PGD₂ als auch Cysteinyl-Leukotriene (synonym Peptidoleukotriene) (Decker 1990, Bilzer 2005). So scheint z.B. Thromboxan A₂ (Häussinger 1988) vasokonstriktorisches Effekte durch Kontraktion von hepatischen Ito-Zellen (Kawada 1993) auszulösen. Vasokonstriktorisches Effekte durch aktivierte KS erscheinen deshalb prinzipiell möglich.

Gleichzeitig bilden aktivierte KS auch die vasorelaxierenden Prostaglandine E₂ und I₂ sowie NO (Decker 1990), wobei PGE₂ hier besonders eine autoregulatorische Rolle zu spielen scheint, indem es die Synthese von Prostaglandinen und TNF- α durch die Kupferzellen inhibiert. Hierdurch könnten vasokonstriktorisches Effekte teilweise oder vollständig kompensiert bzw. antagonisiert werden.

1.8 Bildung von Eikosanoiden

Eikosanoide sind biologisch aktive Arachidonsäuremetabolite, deren Synthese über die Freisetzung von Arachidonsäure durch Phospholipasen und die anschließende Umwandlung durch Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen erfolgt (Samuelson 1987). Cyclooxygenasen (COX), die den entscheidenden Stoffwechselschritt in der Bildung der Prostaglandine aus Arachidonsäure katalysieren, kommen in den Isoformen COX-I und COX-II vor.

COX-I wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert, während COX-II erst durch inflammatorische Stimuli induziert wird.

So konnte in normalen, gesunden Lebern auch nur die Expression von COX-I, nicht aber die von COX-II nachgewiesen werden (Okamoto 2000). Verantwortlich für die Bildung besagter Prostaglandine sind in der Leber vor allem Endothelzellen und Kupffer'sche Sternzellen. Hepatozyten wiederum bilden keine Prostaglandine, sie degradieren diese nur (Decker 1990).

Zu den von den Endothel- und Kupffer-Zellen gebildeten Prostaglandinen gehören unter anderem Prostaglandin $F_{2\alpha}$, D_2 und E_2 sowie das über den Thromboxan-Synthase-Weg gebildete Thromboxan A_2 , welches aufgrund seiner Instabilität nahezu umgehend in das biologisch inaktive Thromboxan B_2 umgewandelt wird (Samuelson 1987) (**Abb. 8**).

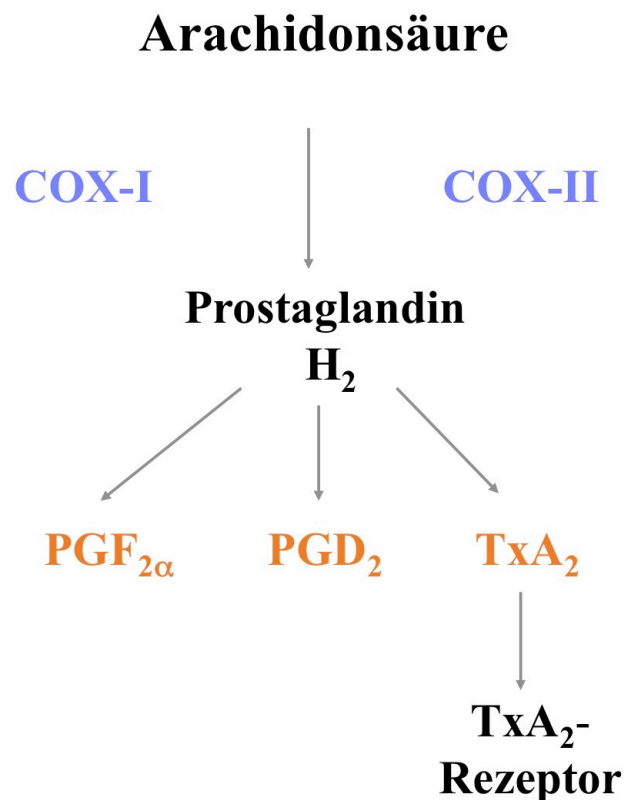


Abbildung 8: Bildung der Prostaglandine. Detaillierte Beschreibung im Text.

Die verschiedenen Prostaglandin-Rezeptoren wiederum sind auf den Hepatozyten und nicht-parenchymalen Leberzellen in unterschiedlicher Ausprägung exprimiert. So finden sich im Bereich der kontraktilen hepatischen Sternzellen vorwiegend $\text{PGF}_{2\alpha}$ - und PGD_2 -Rezeptoren, während die Hepatozyten und Endothelzellen alle Rezeptoren exprimieren (Fennekohl 1999).

Die Verstoffwechslung von Arachidonsäure über den Lipoxygenase-Weg führt zur Bildung von Leukotrienen. Insbesondere für die Gruppe der Cysteinyl-Leukotriene LTC_4 und LTD_4 wurden in der Leber ausgeprägte vasokonstriktorische Eigenschaften beschrieben (Bilzer 1993, Lauterburg 1993). Ferner konnte im Falle einer LTC_4 - und LTD_4 -Zufuhr zusätzlich eine massive Steigerung der sinusoidalen GSH-Freisetzung nachgewiesen werden (Bilzer 1993). Unklar ist hingegen, ob dieses Phänomen auch durch die von den Kupffer-Zellen gebildeten Cys-Leukotriene ausgelöst werden kann.

1.9 Steatosis hepatis

Die Verfettung (Steatose) ist eine häufige Erkrankung der Leber mit einer reversiblen oder irreversiblen Einlagerung von Fett (überwiegend von Triglyceriden) in die Leberzelle in Form von Fettvakuolen, z.B. durch Überernährung (Hyperalimentation), Alkoholmissbrauch, Medikamente, Toxine oder im Rahmen eines Diabetes mellitus und stellt im Rahmen einer möglichen Hepatitis oder Zirrhose eine bedeutende Vorschädigung der Leber dar. Interessanterweise wurde in Fettlebern eine erhöhte Anzahl und Aktivität der für die ROS-Bildung bedeutsamen Kupffer-Zellen (Teramoto 1993) sowie eine vermehrte peroxismale β -Oxidation von Fettsäuren beobachtet (Day 1998), die wiederum eine weitere Quelle für ROS darstellen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in Fettlebern neben einer gesteigerte Lipidperoxidation (Koneru 1995) eine reduzierte Aktivität der Katalase nachgewiesen werden, was auf eine Reduktion der intrazellulären antioxidativen Kapazität zugunsten prooxidativer Mechanismen hinweist (Soltys 2001). Dagegen ist noch unbekannt, ob in Fettlebern die sinusoidale Ausscheidung von Glutathion gestört ist. Auch dieser Mechanismus könnte eine gesteigerte Vulnerabilität erklären, da das von den Hepatozyten freigesetzte GSH die Leber vor vaskulärem oxidativen Stress durch aktivierte Kupffer-Zellen schützt (Jaeschke 1991).

Angesichts der enormen Bedeutung der ROS-Bildung durch KC sowie ersten Hinweisen für eine Zunahme der KC-Dichte und ROS-Bildung in Fettlebern wurde in der vorliegenden Dissertationsschrift die Hypothese einer in Fettlebern gestörten sinusoidalen GSH-Freisetzung im Falle einer KC-Aktivierung untersucht.

Fragestellung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Ausscheidung von GSH durch die Leber in den portalen Blutstrom bei systemischen Entzündungen massiv gesteigert wird. Dieses Phänomen wird durch eine gesteigerte Versorgung extrahepatischer Gewebe mit dem Antioxidanz GSH als endogener Schutzmechanismus gegen die bei Entzündungsreaktionen vermehrt gebildeten Sauerstoffradikale angesehen. Unbekannt war hingegen, über welchen Mechanismus diese Aktivierung ausgelöst und reguliert wird. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die bei Entzündungen aktivierten Kupffer'schen Sternzellen der Leber einen entscheidenden Anteil an der Bildung und Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wie Prostaglandine und Leukotriene, freier Sauerstoffradikale (ROS) sowie anderer pro-inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6) und Eicosanoide haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Beantwortung folgender Fragen:

1. Wird der sinusoidale GSH-Export der Hepatozyten durch KS reguliert?
2. Welche parakrinen Mediatoren sind an dieser Zell-Zell-Interaktion beteiligt?

Durch Experimente mit Inhibitoren/Antagonisten der Bildung und Wirkung von Eicosanoiden sowie durch direkte Zufuhr von Prostaglandinen und Leukotrienen sollte insbesondere:

- a. die Rolle von Prostaglandinen
- b. die Bedeutung von Leukotrienen

untersucht werden.

3. Ist die Regulation der hepatischen GSH-Ausscheidung durch Kupffer-Zellen bei Lebererkrankungen gestört?

Diese Frage sollte in einem ersten experimentellen Ansatz am Modell der makrovesikulären Leberverfettung homozygoter Zucker-Ratten untersucht werden.

Material und Methoden

1.10 Experimentelle Modelle und Versuchsprotokoll

1.10.1 Rattenleber – Perfusion

Die hier durchgeführten Rattenleber-Perfusionen stellen eine Organentnahme dar und sind als solche anzeige-, aber nicht genehmigungspflichtig. Der Anzeigepflicht wurde durch Meldung an die Regierung von Oberbayern nachgekommen.

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (250-300 g) und männliche homozygote Zucker-Ratten (480 – 560 g) (Charles-River Wiga GmbH, Sulzfeld) wurden in einem klimatisierten Raum bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Bis zum Versuchsbeginn erhielten die Tiere uneingeschränkt Wasser und Standardfutter der Firma Altromin (Lage). Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion (50 mg Narcoren/kg Körpergewicht) anästhesiert und nach einem standardisierten Protokoll operiert (Sies 1978; Bilzer 1999). Nach Injektion von 250 IU Heparin in die V. femoralis erfolgte die Laparotomie zur Darstellung der Leberpforte und V. cava inferior. Bei erhaltenem Blutkreislauf wurde die Pfortader mit einem Polyethylen-Tubus (16 gauche) kanüliert und die Leber umgehend mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert (30-33 ml/min). Ein ausreichender Perfusatabfluß war durch Inzision der Aorta abdominalis sichergestellt. Nach Thorakotomie wurde die V. cava inferior über den rechten Herzvorhof kanüliert, anschließend die V. cava inferior unterhalb der Lebervenen und oberhalb des Abgangs der Nierenvenen ligiert. Durch diesen Schritt konnte das venöse Leberperfusat vollständig über die in der V. cava inferior liegende Kanüle gewonnen werden. Zur Ableitung der Galle wurde der Ductus choledochus mit einem Polyethylen-Katheter (Länge 5 cm, Innendurchmesser 0.4 mm, totales Innenvolumen 6 µl) kanüliert. Die volumenkonstante, nicht rezirkulierende Perfusion der Leber erfolgte in allen Versuchen ausschließlich über die Pfortader (Abb. 9). Der Perfusatdurchfluß durch die Leber betrug 3.0-3.5 ml/min x g Leber. Zur Leberperfusion wurde ein Hämoglobin- und Albumin- freier Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7.40, 37°C) verwendet.

Der Puffer wurde durch einen thermostatisierten Schlauchoxygenator geleitet und dabei mit Carbogen (O_2 95%, CO_2 5%) begast, wodurch ein konstanter pH-Wert von 7.40 und eine Temperatur von $37^\circ C$ erreicht werden konnte (Sies 1978, Akerboom 1982). Der Schlauchoxygenator bestand aus einem ca. 15 m langen Silikonschlauch (Wandstärke 0.2 mm, Innendurchmesser 2 mm), der um einen thermostatisierten Aluminiumblock gewickelt war. Diese Einheit befand sich in einer gasundurchlässigen Plexiglaskammer, deren Innenraum mit Carbogen begast wurde. Substanzzugaben erfolgten über Infusionspumpen in das zufließende Perfusat vor Eintritt in eine Blasenfalle (Volumen 10 ml), welche ca. 20 cm vor der Pfortaderkanüle platziert war. Hierdurch wurde bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 50-400 $\mu l/min$ eine homogene Lösung der zugeführten Stammlösungen sichergestellt. Die Anordnung der verschiedenen Elemente der Perfusionsanlage ist schematisch in **Abb. 9** dargestellt. Galle- und Perfusatproben wurden in Eppendorf-Cups gesammelt und bis zur Analyse im Eisbad aufbewahrt. Am Ende der Perfusion wurde das Feuchtgewicht der Leber bestimmt.

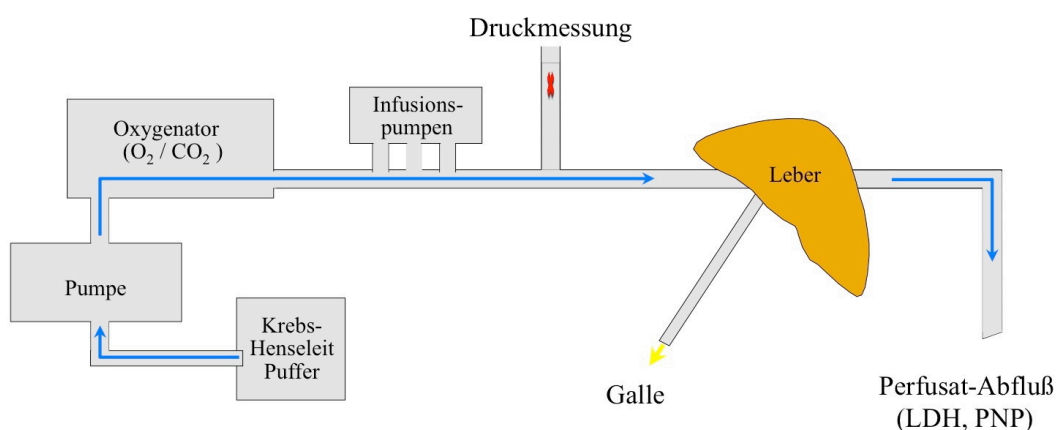


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber. Detaillierte Beschreibung im Text.

1.10.2 Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen

Zur Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen wurden die Lebern nach Kanülierung der Pfortader von der 40. - 46. Minute mit Zymosan (150 μ g/ml) perfundiert (Bilzer 2002). Zymosan ist ein β -Glykan-reiches Zellwandextrakt der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren Suspensionen in Krebs-Henseleit-Puffer zur Destruktion der endogenen Phospholipase A₂-Aktivität 30 Minuten bei 95°C inkubiert (Dieter 1987) und anschließend auf 37°C abgekühlt wurden.

Folgende Gruppen wurden untersucht (**Abb.10**):

Kontrollen: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer über 100 Minuten (n=6).

Zymosan: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 μ g/ml) von der 40. - 46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

GdCl₃ und Zymosan: Zur Identifizierung Kupffer-Zell-vermittelter Effekte wurden die Tiere 48 h und 24 h vor dem Perfusionsexperiment mit Gadoliniumchlorid (GdCl₃, 10 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal) behandelt, was in der verwendeten Dosis zu einer Blockade der Kupffer-Zellen führt (Schauer 2001, Bilzer 2002).

Die Lebern dieser Tiere wurden mit Krebs-Henseleit Puffer perfundiert und Zymosan (150 μ g/ml) von der 40. - 46. Minute nach Kanülierung der Pfortader zugeführt (n=6)

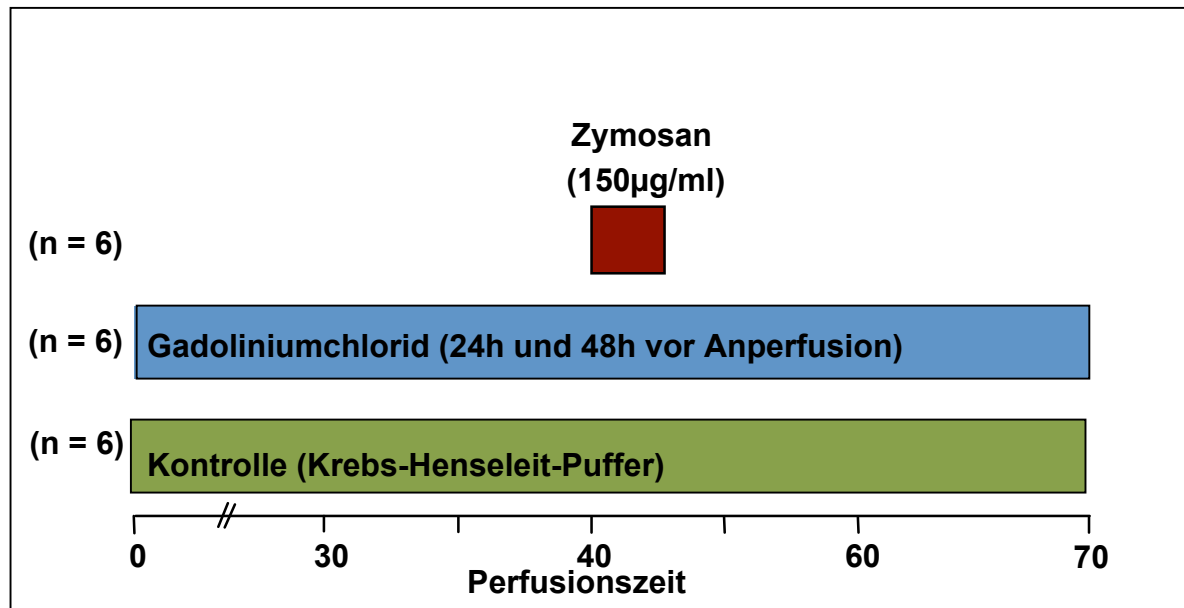


Abbildung 10: Versuchsprotokoll zur Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen in der Leber. Detaillierte Beschreibung im Text.

1.10.3 Hemmung des Cyclooxygenase-Weges

Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der von aktivierten Kupffer-Zellen gebildeten Prostaglandine erfolgte anhand von Inhibitoren der Cyclooxygenase und Thromboxansynthase bzw. deren Antagonisten in folgenden experimentellen Gruppen (**Abb.11**):

Zymosan: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

DMSO: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150µg/ml) von der 40. - 46. Minute. DMSO, das Lösungsmittel für unten aufgeführte Inhibitoren und Antagonisten, wurde von der 30.-60. Minute mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt (Endkonzentration im Perfusat 22 mM) (n=5).

Indomethacin: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute. Indomethacin (50 µM), ein Inhibitor der Cyclooxygenasen I und II, wurde von der 30.-60. Minute infundiert (n=5).

SC 560: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute. SC 560 (0.4 µM), ein spezifischer Inhibitor der Cyclooxygenase I, wurde von der 30. - 60. Minute zugegeben (n=5).

BM 13.177: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute. BM 13.177 (20 µM), ein selektiver Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonist, wurde von der 30.-60. Minute infundiert (n=5).

Furegrelate: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute. Furegrelate (50 µM), ein Thromboxan- Synthesehemmer, wurde von der 30.-60. Minute verabreicht (n=4).

Alle Inhibitoren und Rezeptorantagonisten wurden in DMSO gelöst und mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt.

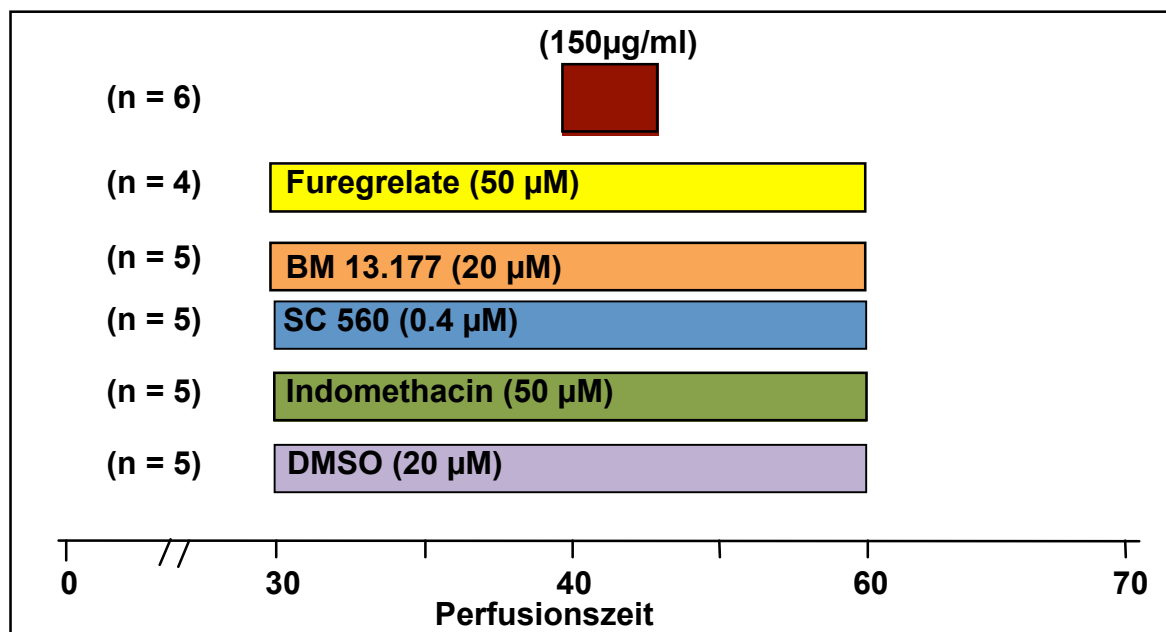


Abbildung 11: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Cyclooxygenase-Weges. Detaillierte Beschreibung im Text.

1.10.4 Perfusion der Leber mit Prostaglandinen

In weiteren Experimenten sollte der Einfluss extern zugefügter Prostaglandine auf die sinusoidale Glutathion-Ausscheidung weiter charakterisiert werden. Folgende Gruppen wurden untersucht:

Kontrollen: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer über 70 Minuten (n=6).

Prostaglandin D₂ (PGD₂): Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von PGD₂ (3.0 µM) von der 40. - 48. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=5).

Prostaglandin E₂ (PGE₂): Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Infusion von PGE₂ (3.0 µM) von der 40. - 48. Minute (n=5).

Prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}): Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von PGF_{2a} (3.0 µM) von der 40. - 48. Minute (n=5).

U-46619: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Infusion von U-46619 (0.1 µM), einem TxA₂- Rezeptoragonisten, von der 40. - 48. Minute (n=5). PGD₂, PGE₂, PGF_{2a} und U-46619 wurden in DMSO gelöst und über Mikroinfusionspumpen mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt.

1.10.5 Untersuchung des Lipoxygenase-Weges

Um den Einfluß des Lipoxygenase-Weges auf die hepatische Glutathion-Ausscheidung nach Kupffer-Zell-Aktivierung genauer zu untersuchen, wurden folgende Experimente durchgeführt (**Abb.12**):

Zymosan: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

MK 886: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 $\mu\text{g/ml}$) von der 40. - 46. Minute. MK 886 (4 μM), ein spezifischer Inhibitor der 5-Lipoxygenase, wurde von der 30. - 60. Minute zugeführt (n=6).

LY 171883: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 $\mu\text{g/ml}$) von der 40. - 46. Minute. LY 171883 (20 μM), ein spezifischer Cy s-LT₁- Rezeptorantagonist, wurde von der 30. - 60. Minute zugeführt (n=6).

MK 886 und LY 171773 wurden in DMSO gelöst und über Mikroinfusionspumpen mit einer Geschwindigkeit von 50 $\mu\text{l/min}$ zugeführt.

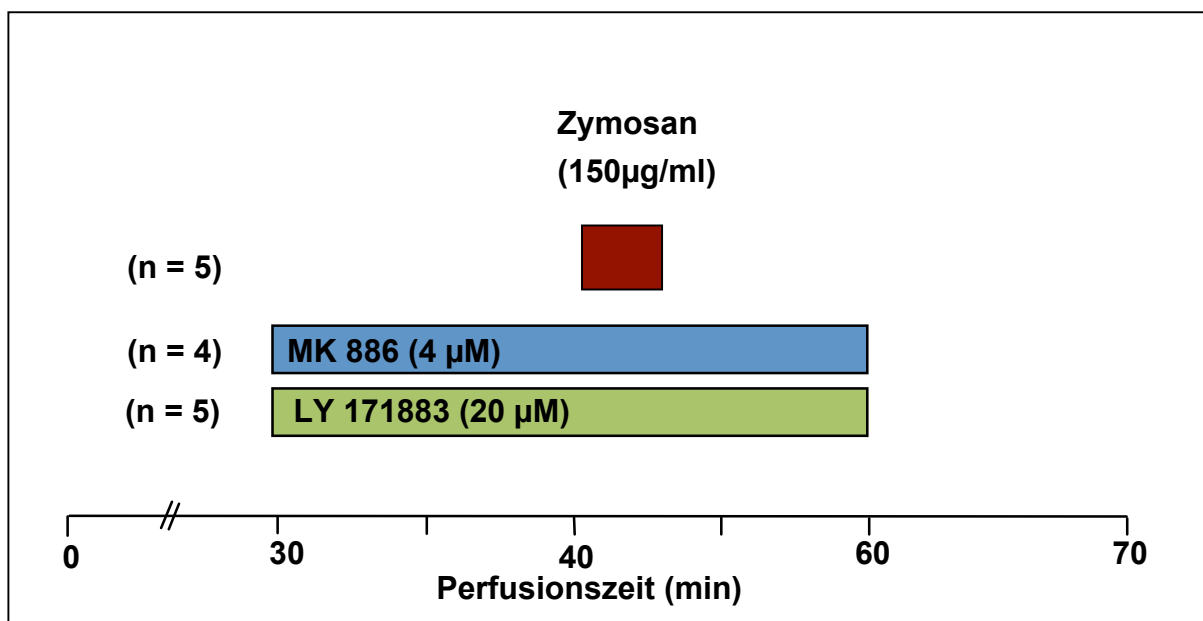


Abbildung 12: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Lipoxygenase- Weges.
Detaillierte Beschreibung im Text.

1.10.6 Perfusion der Leber mit LTC₄

Der Einfluß von LTC₄ auf die hepatische Glutathion-Ausscheidung wurde durch den Vergleich der folgenden Gruppen untersucht:

Kontrollen: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer über 70 Minuten (n=6).

LTC₄: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von LTC₄ (20 nM) von der 40. - 48. Minute (n=5).

LTC₄ wurde in Krebs-Henseleit- Puffer gelöst und über Mikroinfusionspumpen mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt.

1.10.7 Glutathion- Freisetzung verfetteter Lebern

Für diese Untersuchungen wurden männliche homozygote Zucker-Ratten im Alter von 12 Wochen (Fettlebern) verwendet und mit altersgleichen männlichen Sprague-Dawley (normales Lebergewebe) verglichen. Folgende Experimente wurden durchgeführt:

Sprague-Dawley: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

Zucker: Perfusion der Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer und Zufuhr von Zymosan (150 µg/ml) von der 40. - 46. Minute nach Kanülierung der Pfortader (n=6).

1.11 Bestimmungen

1.11.1 Portaler Druck perfundierter Rattenlebern

Zur Bestimmung des portalen Druckes wurde ein kalibriertes gläsernes Steigrohr verwendet, das über einen Dreiweghahn an die Pfortaderkanüle angeschlossen war (Bilzer 1995). Die Druckwerte (cm H₂O) wurden während der Versuche in 1 - 5-minütigen Abständen abgelesen.

1.11.2 Gallefluß

Galle wurde in 5-minütigen Intervallen in Eppendorf-Cups gesammelt. In den Eppendorf-Cups befanden sich jeweils 50 µl Sulfosalicylsäure zur Vermeidung der Glutathion- Degradation durch die ebenfalls biliär sezernierte γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT). Das gewonnene Gallenvolumen wurde gravimetrisch ermittelt und der Gallefluß pro Minute und Gramm Leber berechnet.

1.11.3 Sinusoidaler Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Efflux

Die sinusoidale LDH-Freisetzung in das Leberperfusat, welche einen empfindlichen Indikator des Zellschadens perfundierter Rattenlebern darstellt (Sies 1978; Bilzer 1999), wurde photometrisch bei 25°C durch folgenden Testansatz bestimmt :

500 µl	Phosphat- Puffer (0.05 M, pH 7.5)
10 µl	Pyruvat (60 mM)
10 µl	NADH (10 mg/ml)
500 µl	Leberperfusat

Die Abnahme der Extinktion bei 365 nm wurde kontinuierlich mit einem Schreiber registriert. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Extinktionskoeffizient $e_{365}=3.34 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet.

1.11.4 Bestimmung von Thromboxan B₂ und Prostaglandin F_{2α}

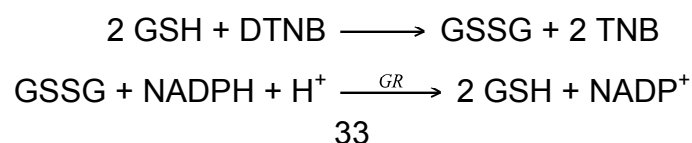
Thromboxan B₂ wurde mit dem standardisierten Radio-Immunoassay (RIA)-Kits der Firma Amersham Pharmacia Biotech bestimmt. Für Thromboxan B₂ werden vom Hersteller folgende Kreuzreaktivitäten angegeben: Thromboxan B₂ 100%, Prostaglandin F_{1α} <1.0%, Prostaglandin F_{2α} 0.4%, Prostaglandin E₁ <0.03%; alle anderen Kreuzreaktivitäten lagen unter 0.03%.

Prostaglandin F_{2α} wurde mit dem standardisierten Enzym-Immunoassay (EIA) der Firma Assay Designs, Inc gemessen. Folgende Kreuzreaktivitäten werden vom Hersteller angegeben: Prostaglandin F_{2α} 100%, Prostaglandin F_{1α} 11.82%, Prostaglandin D₂ 3.62%, 6-keto-Prostaglandin F_{1α} 1.38%, Prostaglandin I₂ 1.25%, Prostaglandin E₂ 0.77%, Thromboxan B₂ 0.77%; alle anderen Kreuzreaktionen lagen unter 0.77%.

Die Berechnung der Prostaglandin-Konzentrationen erfolgte mittels Standardkurven. Die Perfusatproben wurden in verschiedenen Verdünnungsschritten bestimmt. Hierdurch wurden von jeder Probe Messwerte innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurven gewonnen.

1.11.5 Gesamt-Glutathion in Galle und Leberperfusat

Die Summe des oxidierten (GSSG) und reduzierten Glutathions (GSH) wurde durch einen kinetischen Test bestimmt (Tietze 1969), der auf folgender Reaktion basiert:



Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme während der nichtenzymatischen Reduktion von 5,5'-Dithiobis(nitrobenzoesäure) (DTNB) durch GSH wurde bei 405 nm aufgezeichnet. Das bei dieser Reaktion entstandene GSSG wurde enzymatisch durch die Glutathion-Reduktase (GR) reduziert, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit der DTNB-Reduktion konstant blieb.

Testansatz:

- 800 µl Phosphat-Puffer (pH 7.4)
- 50 µl NADPH (5 mM)
- 50 µl DTNB (1 mM)
- 50 µl Perfusat (unverdünnt) / Galle (1:1000 verdünnt)
- 20 µl Glutathion-Reduktase (24 U/ml)
- 50 µl GSH-Standard (4 µM)

5 Minuten nach Beginn der Reaktion wurden dem Testansatz 50 µl GSH-Standard (4 µM) zugeführt, um Testhemmungen auszuschließen.

1.11.6 Glutathiondisulfid (GSSG) in Galle und Leberperfusat

Das Verhältnis GSH/GSSG in Leberperfusat und Galle beträgt 10:1 (Akerboom 1981). Die Bestimmung der hepatischen GSSG-Freisetzung erfordert deshalb Maßnahmen zur Vermeidung einer spontanen GSH-Autoxidation zu GSSG. Zur Bestimmung der GSSG-Konzentration wurde aus diesem Grund die von Lauterburg beschriebene Methode der GSH-Konjugation mit N-Ethylmaleimid (NEM) verwendet (Lauterburg 1984).

0.5 ml Perfusat bzw. 0.05 ml Galle (in Sulfosalicylsäure) wurden unmittelbar nach der Gewinnung gleiche Volumina einer 10 mM NEM-Lösung zugefügt. Durch die spontane Reaktion zwischen GSH und NEM zu einem Glutathionkonjugat wurde GSH gebunden und eine GSH-Autoxidation zu GSSG verhindert. Überschüssiges NEM, das den in 3.3.4. beschriebenen kinetischen Test hemmt, wurde durch Trennung über Sep-Pak C₁₈ Kartuschen eliminiert. Sep-Pak C₁₈ Kartuschen wurden hierzu mit 10 ml absolutem Methanol und 10 ml Aqua bidest konditioniert.

Anschließend wurden 500 µl NEM-Perfusat aufgetragen und mit 1 ml Phosphat-/EDTA Puffer (pH 7.4) eluiert. Die GSSG-Konzentrationen der NEM-freien Eluate wurden mit dem in 3.3.5. beschriebenen kinetischen Test ermittelt. Die GSSG-Wiederfindung betrug 90%.

1.11.7 Glutathion (GSH) in Galle und Leberperfusat

Die GSH-Konzentration wurde aus der Differenz zwischen Gesamt-Glutathion (3.2.5.) und Glutathiondisulfid-Konzentrationen (3.2.6.) berechnet.

1.11.8 Gesamt- Glutathion im Lebergewebe

Lebergewebe (1-1.5 g) wurde mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminiumzange schockgefroren. Das Lebergewebe wurde anschließend unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit Perchlorsäure (1.0 M) im Verhältnis 3 ml/g Leber versetzt (Bilzer 2002). Die Säureextrakte wurden 5 min bei 5000 x g zentrifugiert (4°C) und der proteinfreie Überstand zur Bestimmung intrazellulärer Metabolite verwendet.

Die proteinfreien Säureextrakte wurden in Phosphat-Puffer (pH 7.4) 1:1000 verdünnt und 50 µl dieser Verdünnungen anschließend im kinetischen Test zur Glutathion-Bestimmung (siehe 3.2.5.) eingesetzt.

1.11.9 Histologische Untersuchung des Lebergewebes

Das am Ende der Perfusionsversuche gewonnene Lebergewebe wurde in 4%-iger Formalinlösung fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Die anschließend angefertigten 3 µm dünnen Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Im nächsten Schritt erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung verfetteter Hepatozyten pro 10 Gesichtsfelder (1.96 mm², ca. 4000 Hepatozyten) durch Frau Dr. F. Roggel, Pathologisches Institut der LMU.

1.12 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte mit Hilfe des Programmes Graph Pad Prism Version für Windows. Mittelwerte zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Student's-t-Test verglichen. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde die »one-way-ANOVA«-Varianzanalyse angewendet. Ein p-Wert kleiner 0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

1.13 Materialien

1.13.1 Chemikalien

Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
5,5-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetracetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Gadolinium (III) Chlorid Hexahydrat	Sigma, St. Louis
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma, St. Louis
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Sigma, St. Louis
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol absolut	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, reinst	Merck, Darmstadt

Narcoren (Natriumpentobarbital)	Rhone-Merieux
N-Ethylmaleimid (NEM)	Merck, Darmstadt
Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert (NADH)	Boehringer, Mannheim
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert (NADPH)	Boehringer, Mannheim
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Sulfosalicylsäure	Sigma, St. Louis
Zymosan A	Sigma, St. Louis

1.13.2 Rezeptoragonisten und Antagonisten

BM 13.177 (Solutroban)	Boehringer, Mannheim
9,11-Dideoxy-9 α , 11 α -methanoepoxy-prostaglandin F _{2α} (U-46619)	Calbiochem, Bad Soden
Leukotrien C ₄	Sigma, St. Louis
LY 171883	Calbiochem, Bad Soden
Prostaglandin F _{2α}	Calbiochem, Bad Soden
Prostaglandin D ₂	Calbiochem, Bad Soden
Prostaglandin E ₂	Calbiochem, Bad Soden

1.13.3 Enzyme

Glutathion-Reduktase	Sigma, St. Louis
Lactat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim

1.13.4 Enzym- Inhibitoren und Aktivatoren

5-(3-Pyrimidinylmethyl)-benzofurancarboxylsäure (Furegrelate)	Sigma, St. Louis
---	------------------

5-(4-Chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-trifluormethylpyrazol (SC 560)	Calbiochem, Bad Soden
1-(<i>p</i> -Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-essigsäure (Indomethacin)	Sigma, St. Louis
3-[3- <i>tert</i> -Butylthio-1-(4-chloro-benzyl)-5-isopropyl-1H-indol-2-yl]-2,2-dimethylpropionsäure (MK 886)	Calbiochem, Bad Soden

1.13.5 Gase

Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde, Unterschleißheim
---	-------------------------

1.13.6 RIA und ELISA Kits

Thromboxan B ₂ – [¹²⁵] Biotrak Assay	Amersham, Freiburg
Prostaglandin F _{2α} Enzyme Immuno Assay Kit	Assay Design, Ann Arbor

1.13.7 Verbrauchsmaterialien

Sep-Pak C18-Kartuschen	Waters, Milford
------------------------	-----------------

1.13.8 Pufferlösungen

Krebs-Henseleit:

NaCl	118 mM
KCl	4.8 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 mM
NaHCO ₃	25 mM
CaCl ₂	1.5 mM

Ergebnisse

1.14 Perfusion unbehandelter Lebern

Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden volumenkonstant mit Krebs-Henseleit- Puffer perfundiert. Nach einer Äquilibrierungsphase von 30 Minuten betrug die sinusoidale Ausscheidung des reduzierten Glutathions (GSH) 12.8 ± 1.9 nmol/min x g Leber und blieb bis zum Ende der Perfusion nach 70 Minuten nahezu unverändert (13.2 ± 1.8 nmol/min x g Leber) (**Abb.13**). Für das oxidierte Glutathion GSSG wurden hingegen 20-fach geringere sinusoidale Effluxraten des oxidierten Glutathions (GSSG) nachgewiesen, die allerdings während des gesamten Experimentes ebenfalls einen konstanten Verlauf zeigten (**Abb. 14**).

Die biliäre GSH-Ausscheidung lag nach 30 Minuten bei 2.2 ± 0.6 nmol/min x g Leber. Bis zum Ende der Perfusion kam es zu einem nicht signifikanten Abfall der biliären GSH-Ausscheidung auf 1.8 ± 0.2 nmol/min x g Leber (**Abb. 15**), während der Gallefluß konstant blieb (**Abb. 16**). Die biliäre GSSG-Ausscheidung zeigte dagegen einen signifikanten ($p < 0.5$) Abfall von initial 0.42 ± 0.08 auf 0.25 ± 0.04 nmol/min x g Leber nach 30 bzw. 70 Minuten (**Abb. 16**).

Als Parameter der Zellintegrität wurde die sinusoidale LDH-Freisetzung bestimmt. Die sinusoidale LDH- Freisetzung stieg von 3.6 ± 1.4 nach 30 Minuten auf 6.2 ± 2.4 mU/min x g Leber am Ende der Perfusion an (**Abb. 17**).

Insgesamt entsprachen die an unbehandelten Lebern gewonnenen Kontrolldaten sinusoidalen und biliären GSH- und GSSG-Effluxraten früherer Untersuchungen (Eberle 1991; Akerboom 1982; Lauterburg 1984; Bilzer 1990; Geier 2004) sowie der in perfundierten Rattenlebern vorbeschriebenen minimalen Zellschädigung (Sies 1978; Bilzer 1990; Gerbes 1998).

1.15 Stimulation der sinusoidalen GSH-Ausscheidung nach Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen durch Zymosan

Die Aktivierung Kupffer'scher Sternzellen (KS) in perfundierten Rattenlebern erfolgte durch 6-minütige Infusion von Zymosan (150 $\mu\text{g/ml}$). Während der Zymosan- Infusion kam es zu einem signifikanten ($p < 0.05$) Anstieg der sinusoidalen GSH-Ausscheidung von initial 13.9 ± 1.8 auf maximal 29.2 ± 7.2 nmol/min x g Leber (**Abb. 13**). Nach Beendigung der Zymosan- Infusion nahm die sinusoidale GSH-Ausscheidung zunächst stark ab, blieb dann aber bis zum Ende der Perfusion um etwa 5.5 nmol/min x g Leber über dem Ausgangswert signifikant ($p < 0.05$) erhöht (**Abb. 13**).

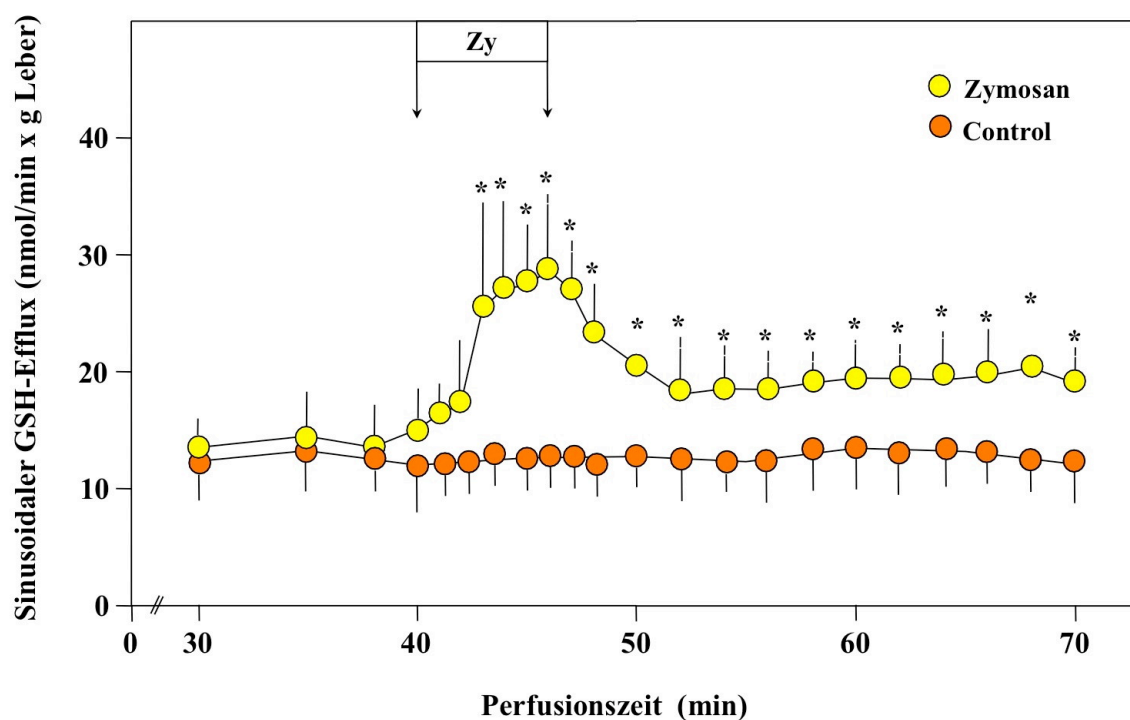


Abbildung 13: Stimulation der sinusoidalen GSH-Ausscheidung nach Infusion von Zymosan. Zymosan (Zy, 150 $\mu\text{g/ml}$) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (●, n=5). Im Vergleich zu Kontrollperfusionsen (●, n=5) führte Zymosan zu einem signifikanten Anstieg der sinusoidalen GSH-Ausscheidung mit einem initialen Peak sowie einer lang anhaltenden Erhöhung bis zum Ende der Perfusion (* $p < 0.05$, $\bar{x} \pm \text{SD}$).

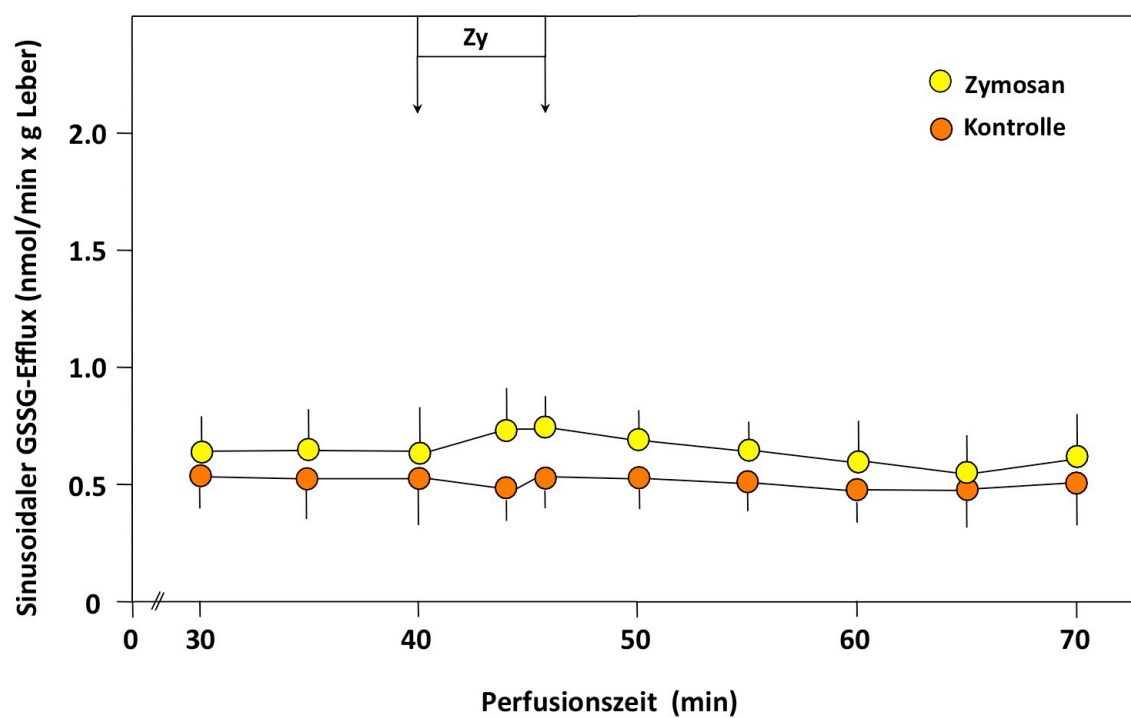


Abbildung 14: Kein Einfluß von Zymosan auf die sinusoidale GSSG-Ausscheidung. Zymosan (Zy, 150 $\mu\text{g/ml}$) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (\bullet , $n=5$). Kontrollelebern (\bullet , $n=5$) wurden ausschließlich mit Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

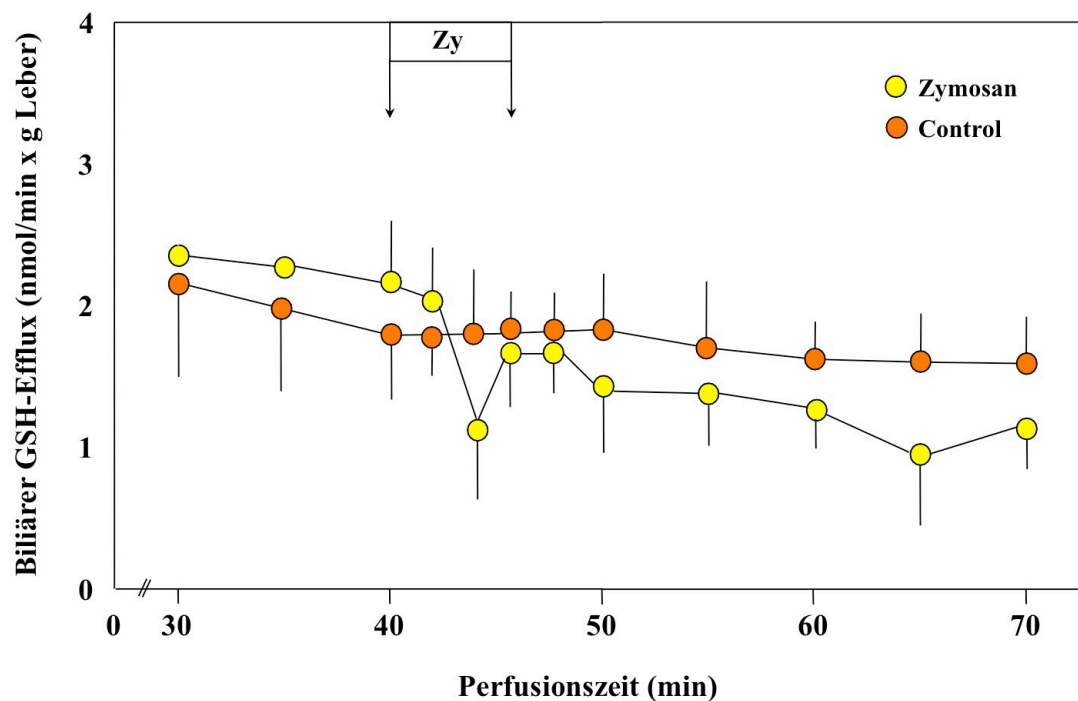


Abbildung 15: Biliäre GSH-Ausscheidung nach KS-Aktivierung durch Zymosan. Zymosan (Zy, 150 $\mu\text{g/ml}$) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (\bullet , $n=5$). Kontrolllebern (\bullet , $n=5$) wurden ausschließlich mit Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

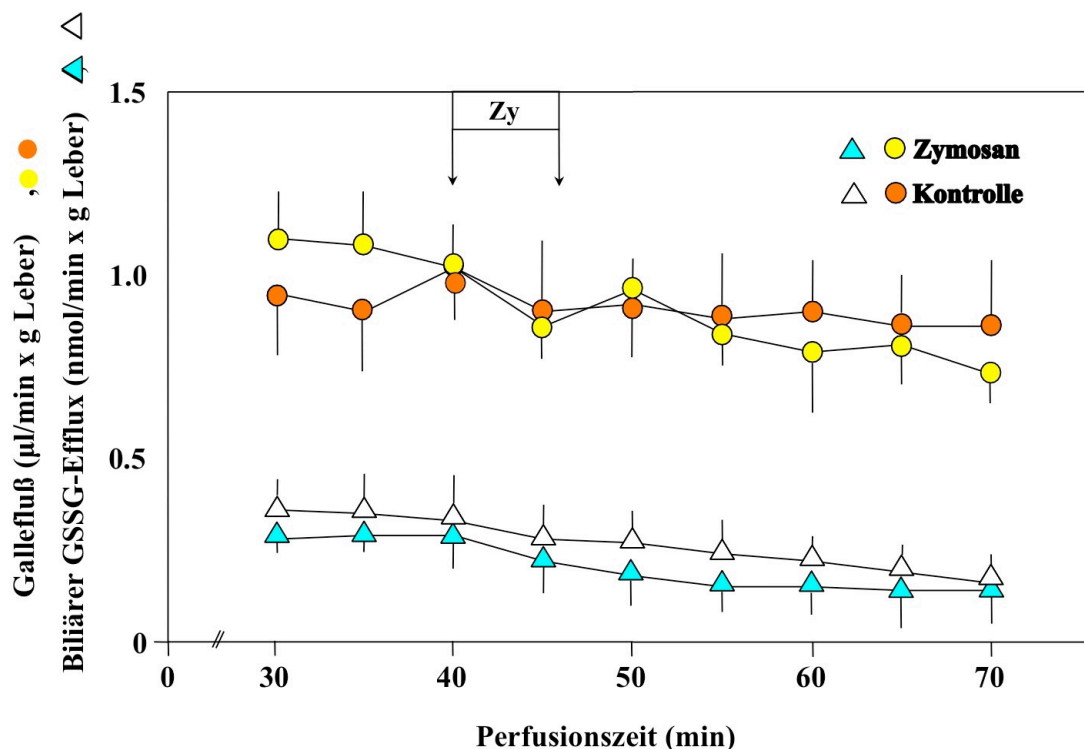


Abbildung 16: Gallefluß und biliäre GSSG-Ausscheidung nach KS-Aktivierung durch Zymosan. Zymosan (Zy, 150 µg/ml) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (n=5). Kontrolllebern (orange/weiß, n=5) wurden ausschließlich mit Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. Weder Gallefluß (Kreise) noch biliäre GSSG-Ausscheidung (Dreiecke) wurden durch Zymosan beeinflusst. ($x \pm SD$).

Letztere Ergebnisse zeigen, dass die massive Zunahme der sinusoidalen GSH-Ausscheidung nach KS-Aktivierung um maximal 15 nmol/min x g Leber nicht durch cholestatische Effekte bzw. eine um maximal 1 nmol/min x g Leber verminderte biliäre GSH-Exkretion erklärt werden kann. In vivo Untersuchungen zeigten eine beträchtliche Schädigung der Leber nach Aktivierung der KS durch Endotoxine (Jaeschke 1999). Dieser Befund erscheint wichtig, da hepatische Zellschäden nach KS-Aktivierung durchaus die vermehrte Freisetzung von Glutathion erklären könnten.

Tatsächlich war ein beträchtlicher hepatischer Zellschaden auch nach Aktivierung der KS durch Zymosan im Modell der perfundierten Rattenleber nachweisbar. Während der Zufuhr von Zymosan kam es zu einer signifikanten ($p < 0.05$) Steigerung der LDH-Freisetzung von initial 3.9 ± 1.8 auf maximal 130 ± 45 mU/min x g Leber (**Abb. 17**).

Dennoch spricht dieses Ergebnis nicht unbedingt für eine durch Zellschäden bedingte sinusoidale GSH-Freisetzung nach KS-Aktivierung, da die sinusoidale Ausscheidung von GSSG mit vergleichbar niedrigem Molekulargewicht nicht erhöht war (**Abb. 14**). Zudem aktiviert Zymosan nicht ausschließlich KS, sondern auch Granulozyten und Endothelzellen der Leber (Decker 1990).

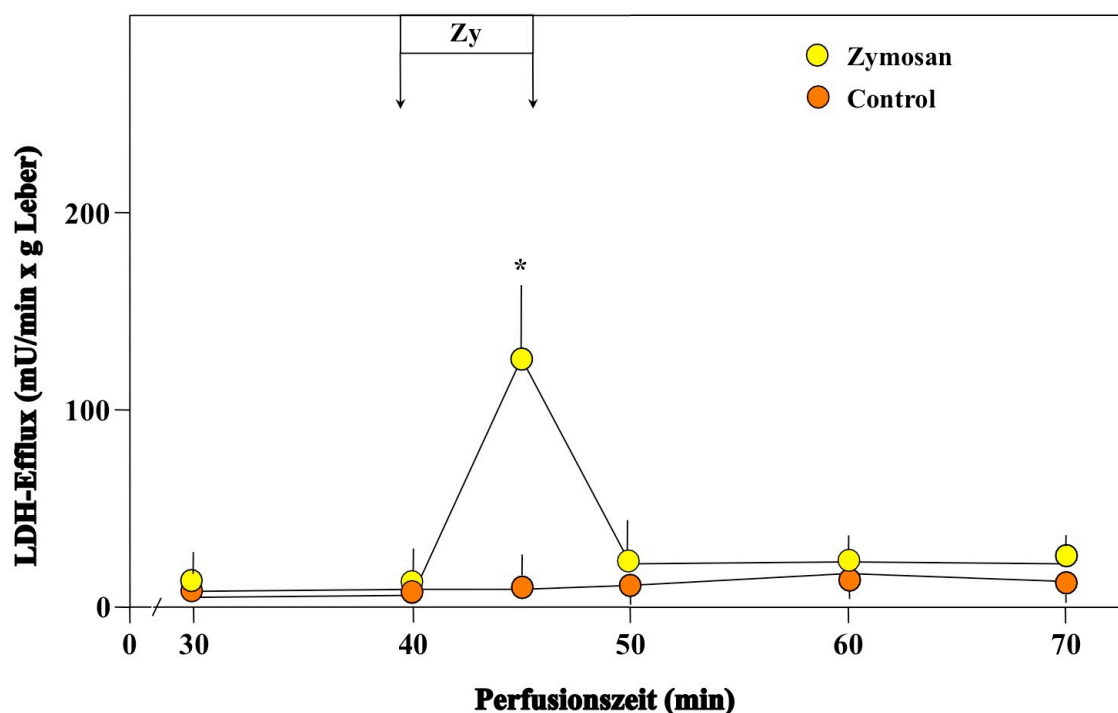


Abbildung 17: Hepatische Zellschädigung nach KS-Aktivierung durch Zymosan. Zymosan (Zy, 150 $\mu\text{g/ml}$) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (\bullet , $n=5$). Kontrolllebern (\bullet , $n=5$) wurden ausschließlich mit Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. Leberzellschäden wurden durch spektrophotometrische Bestimmung der LDH-Aktivität im Leberperfusat erfasst. (* $p < 0.05$, $\bar{x} \pm \text{SD}$).

Weitere Experimente sollten deshalb klären, ob die durch Zymosan induzierte Stimulation der sinusoidalen Glutathion- Ausscheidung und Zellschädigung durch KS mediiert wird. Hierzu wurden die KS durch eine 2-tägige Vorbehandlung der Tiere mit Gadoliniumchlorid funktionell inaktiviert.

Tatsächlich führte die Inaktivierung der KS zu einer vollständigen Hemmung der durch Zymosan stimulierten sinusoidalen GSH- Freisetzung (**Abb. 18**).

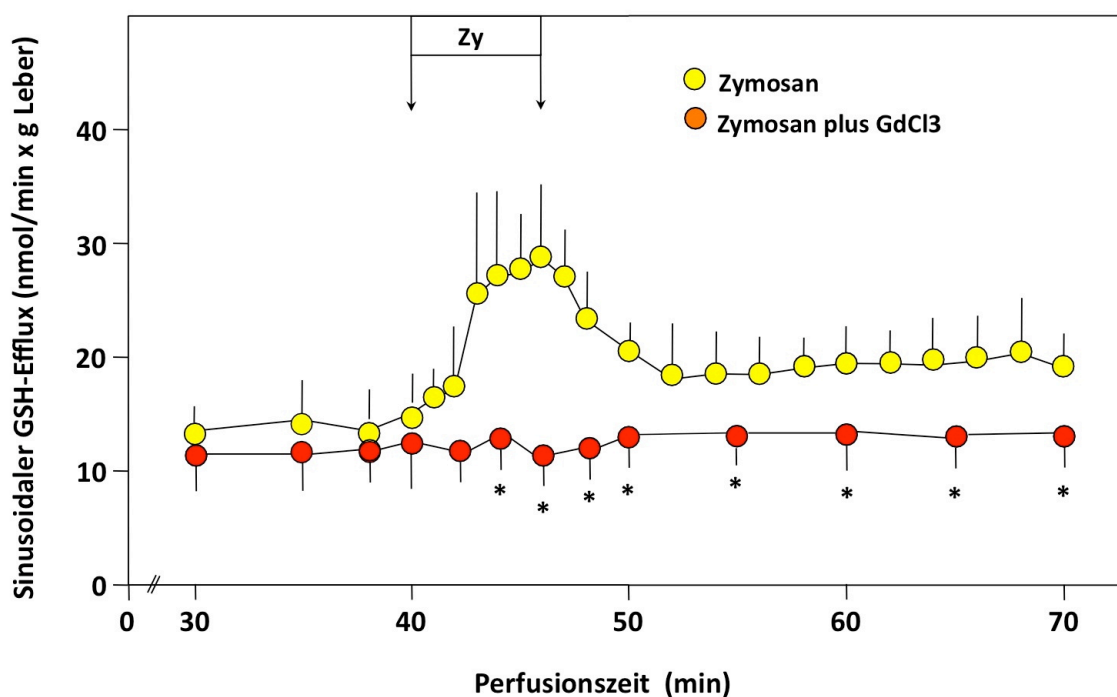


Abbildung 18: Stimulation der sinusoidalen GSH-Ausscheidung durch Zymosan: Hemmung durch funktionelle Inaktivierung der KS. Zymosan (Zy, 150 $\mu\text{g/ml}$) wurde von der 40. – 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (●, $n=5$). Eine weitere Gruppe wurde jeweils 48 h und 24 h vor dem Perfusionsexperiment mit Gadoliniumchlorid (10 mg/kg KG) zur Blockade der Kupfer'schen Sternzellen intraperitoneal injiziert (●, $n=5$). Der Anstieg der sinusoidalen GSH-Ausscheidung wurde durch Gadoliniumchlorid signifikant ($*p<0.05$) vermindert ($\bar{x}\pm\text{SD}$).

Auch der durch Zymosan induzierte Zellschaden wurde durch die Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid nahezu vollständig aufgehoben (**Abb. 19**). Die Stimulation der sinusoidalen GSH-Ausscheidung und Zellschädigung durch Zymosan kann somit auf eine Aktivierung der KS zurückgeführt werden.

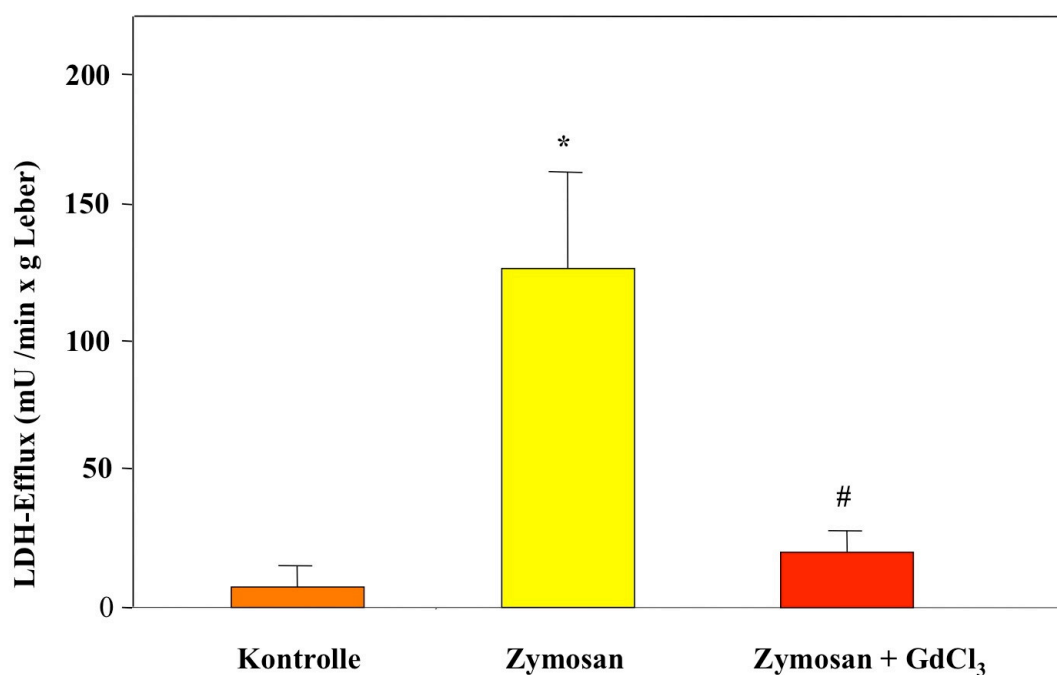


Abbildung 19: Inaktivierung der KS vermindert hepatische Zellschäden durch Zymosan. Dargestellt sind die maximalen LDH- Effluxraten der Experimente der Abb. 5 und 6 zur 45. Minute. (* $p < 0.05$ vs Kontrollen, # $p < 0.05$ vs Zymosan, $x \pm SD$).

1.16 Die Rolle von Prostaglandinen bei der Stimulation der hepatischen GSH-Ausscheidung nach KS- Aktivierung

1.16.1 Gesteigerte Bildung von Prostaglandinen durch aktivierte KS

Die Aktivierung isolierter KS durch Zymosan führt zur gesteigerten Bildung und Freisetzung verschiedener Prostaglandine wie z.B. TxA_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , PGE_2 und Prostacyclin (Decker 1990). Durch die folgenden Experimente sollte deshalb eine mögliche Beteiligung von Prostaglandinen an der Stimulation der sinusoidalen GSH-Freisetzung nach KS-Aktivierung untersucht werden.

Im ersten Schritt wurde zunächst die Bildung von TxA_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGD_2 in perfundierten Rattenlebern nach Aktivierung der KS durch Zymosan untersucht.

Wie in den **Abbildungen 20 und 21** sowie in **Tabelle 3** dargestellt, kam es noch während der Zufuhr von Zymosan zu einem massiven Anstieg der sinusoidalen TxA_2 - und $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Effluxraten mit entsprechender Erhöhung ihrer Konzentration im Leberperfusat. Maximale Effluxraten wurden dabei zum Zeitpunkt der maximalen GSH-Ausscheidung erreicht. Die durch Zymosan stimulierten Prostaglandin-Effluxraten wurden durch eine funktionelle Inaktivierung der KS durch Gadoliniumchlorid nahezu vollständig aufgehoben (**Tabelle 3**). Diese Ergebnisse zeigen die massive Zunahme der hepatischen Prostaglandinbildung durch aktivierte KS sowie ihre mögliche Beteiligung bei der Stimulation der hepatischen GSH-Freisetzung.

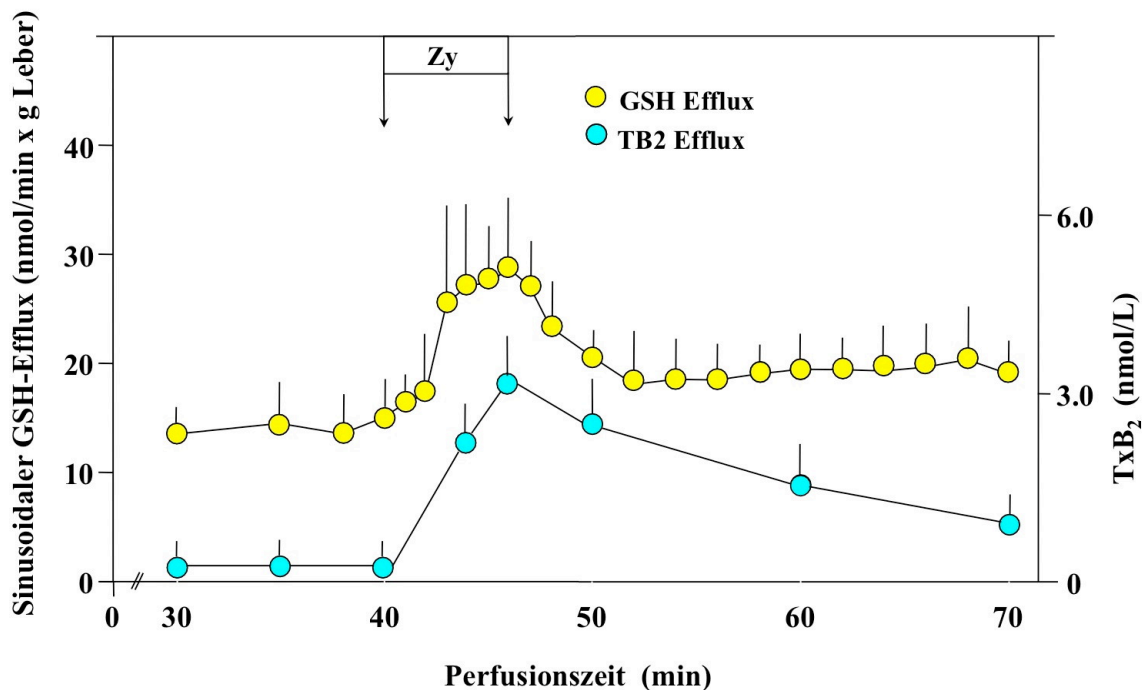


Abbildung 20: Stimulation der sinusoidalen GSH- und TxB₂- Effluxraten durch Zymosan. Zymosan (Zy, 150 µg/ml) wurde von der 40. – 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (n=5). ●, sinusoidale GSH-Effluxraten; ●, TxB₂ -Konzentration im Leberperfusat. ($x \pm SD$).

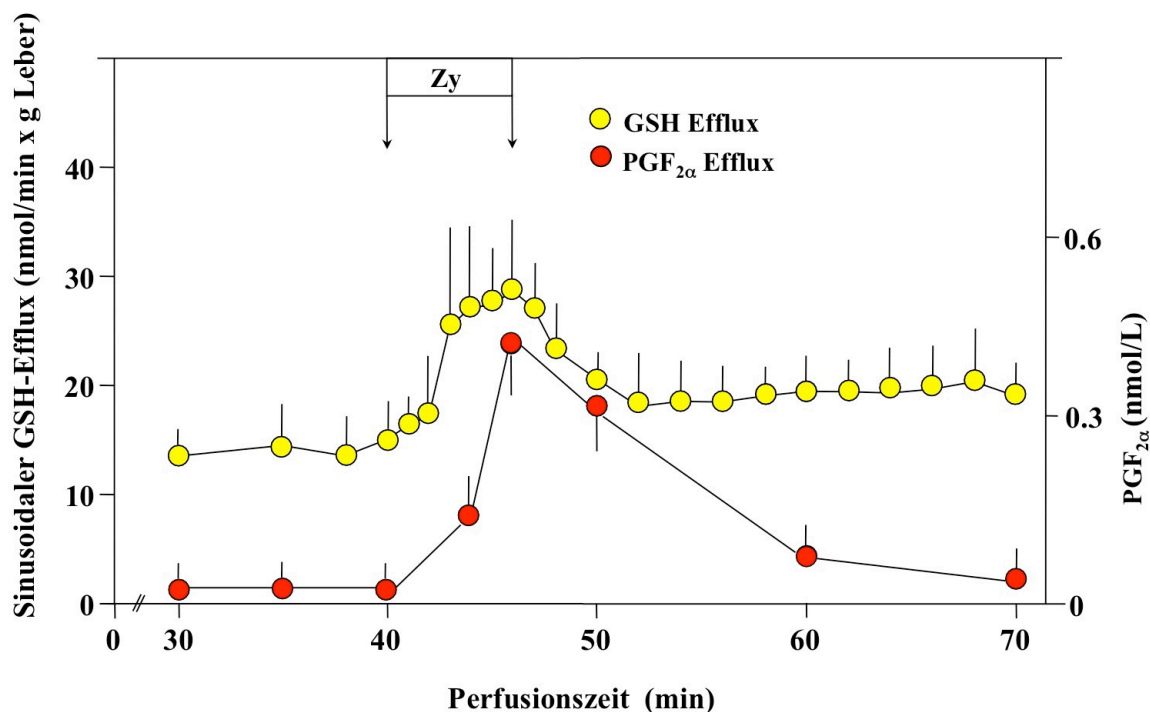


Abbildung 21: Stimulation der sinusoidalen GSH- und PGF_{2α}- Effluxraten durch Zymosan. Zymosan (Zy, 150 µg/ml) wurde von der 40. – 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (n=5). ●, sinusoidale GSH-Effluxraten; ●, TxB₂-Konzentration im Leberperfusat. ($\bar{x} \pm SD$).

Tabelle 3: Prostaglandin-Effluxraten (pg/min x g Leber) nach KS- Aktivierung

	PGD ₂	PGF _{2α}	TxB ₂
Kontrolle	200 ± 37 *	<50 *	<120 *
Zymosan	7440 ± 717	701 ± 61	4218 ± 789
Zymosan + GdCl ₃	669 ± 180 *	194 ± 28 *	435 ± 68 *

Maximale Prostaglandin- Effluxraten wurden 6 Minuten nach KS Aktivierung durch Zymosan (150 µg/ml) mittels RIA und ELISA ermittelt. Gadoliniumchlorid (GdCl₃, 10 mg/kg Körpergewicht) wurde intraperitoneal 48 und 24 Stunden vor den Experimenten appliziert. ($x \pm SD$) (n=5/Gruppe), (* p<0.05 vs Zymosan- Gruppe)

1.16.2 Funktionelle Bedeutung der gesteigerten Prostaglandin- Bildung durch aktivierte KS

Die funktionelle Bedeutung der von KS nach Aktivierung freigesetzten Prostaglandine wurde im nächsten Schritt durch Perfusionsexperimente mit Inhibitoren der Cyclooxygenase-I und Thromboxan A₂ – Synthase sowie einem spezifischen TxA₂ – Rezeptor-Antagonisten untersucht (**Abb. 22**). Die Behandlung der Lebern mit dem COX-I/COX-II Inhibitor Indomethacin (50 µM) führte zu einer vollständigen Hemmung (p<0.05) der durch Zymosan stimulierten sinusoidalen Effluxraten im Vergleich zur alleinigen Zymosangabe (**Abb. 23**).

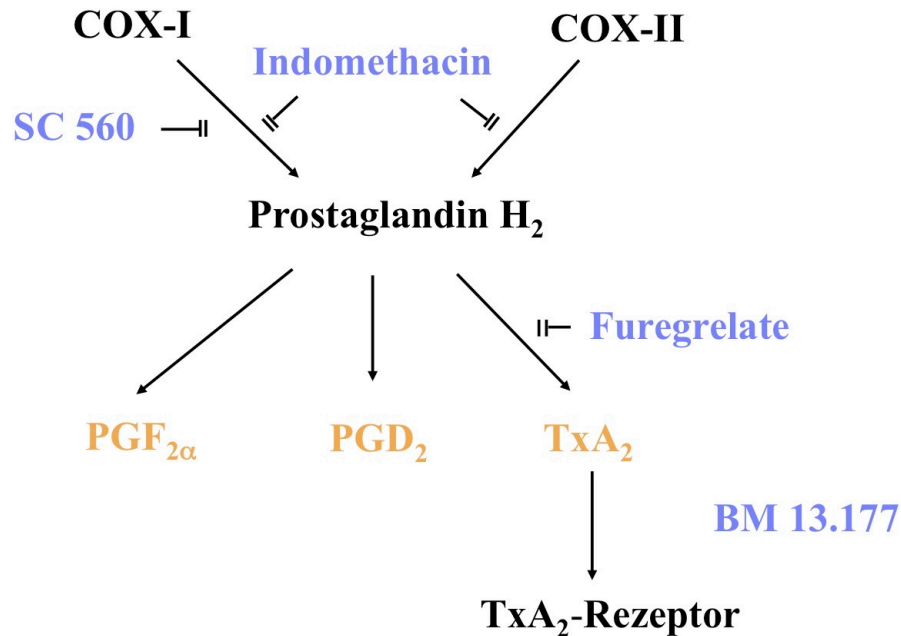


Abbildung 22: Prostaglandinsynthese: Inhibitoren und Rezeptor-Antagonisten.

Die mit Indomethacin beobachteten inhibitorischen Effekte waren nicht auf den Lösungsvermittler DMSO zurückzuführen, da es bei alleiniger Gabe von DMSO zu keiner signifikanten Beeinflussung des GSH- Effluxes nach KS- Aktivierung kam (**Abb. 23**).

Da in der hier untersuchten gesunden Rattenleber ausschließlich COX-I Aktivität nachgewiesen werden kann (Crofford 1997), wurde in weiteren Experimenten der Einfluß des spezifischen COX-I- Inhibitors SC 560 untersucht.

Abermals kam es zu einer vollständigen Hemmung der durch Zymosan stimulierten sinusoidalen GSH- Freisetzung (**Abb. 24**).

Indomethacin und auch SC 560 führten ferner zu einer vollständigen Hemmung der Zymosan- induzierten Zellschädigung (**Abb. 25**).

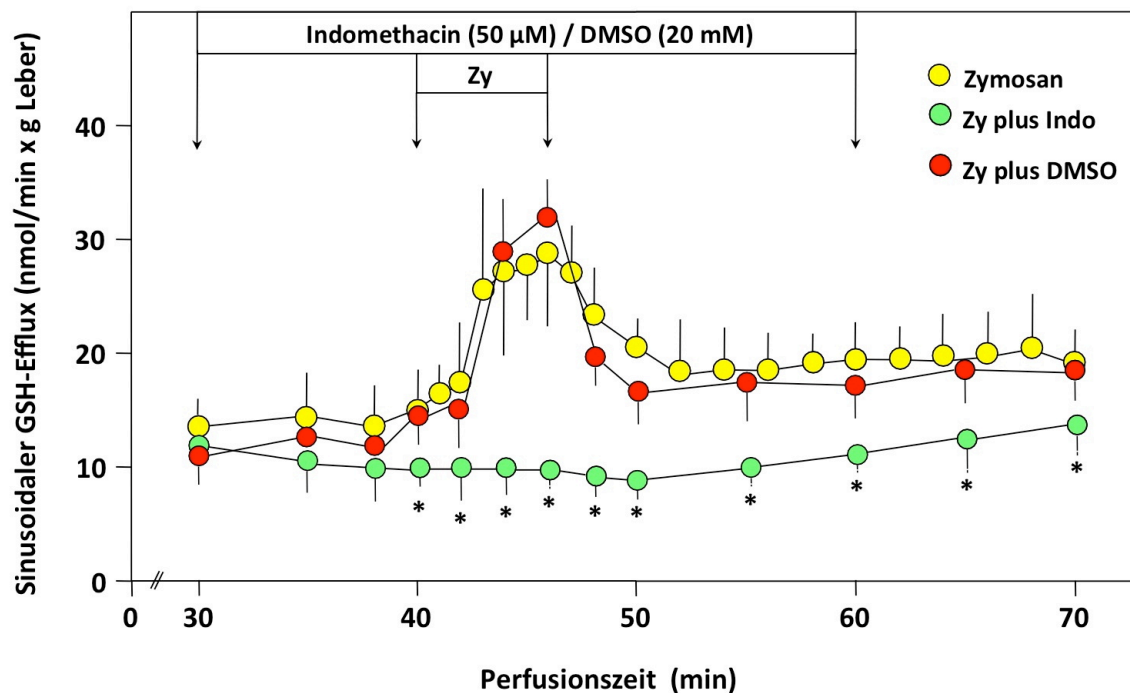


Abbildung 23: Hemmung der sinusoidalen GSH-Ausscheidung durch Indomethacin. Zymosan (Zy, 150 µg/ml) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion in Abwesenheit (●, n=5) und Anwesenheit von DMSO (●, n=5) oder Indomethacin (●, n=5) infundiert. (*p<0.05 vs Zymosan +/- DMSO, $\bar{x} \pm SD$).

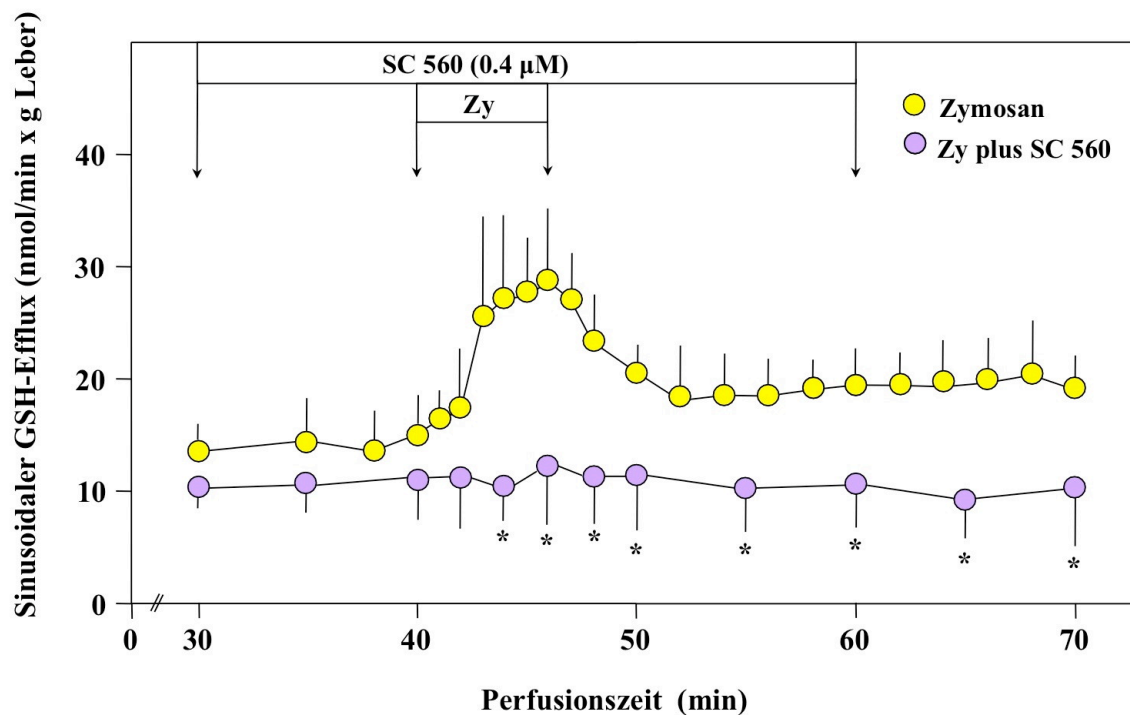


Abbildung 24: Hemmung der sinusoidalen GSH-Ausscheidung durch selektive COX-I Inhibition. Zymosan (Zy, 150 $\mu\text{g/ml}$) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion in Abwesenheit (\bullet , $n=5$) oder Anwesenheit (\circ , $n=5$) des spezifischen COX-I Inhibitors SC 560 zugeführt. (* $p<0.05$ vs Zymosan, $x \pm \text{SD}$).

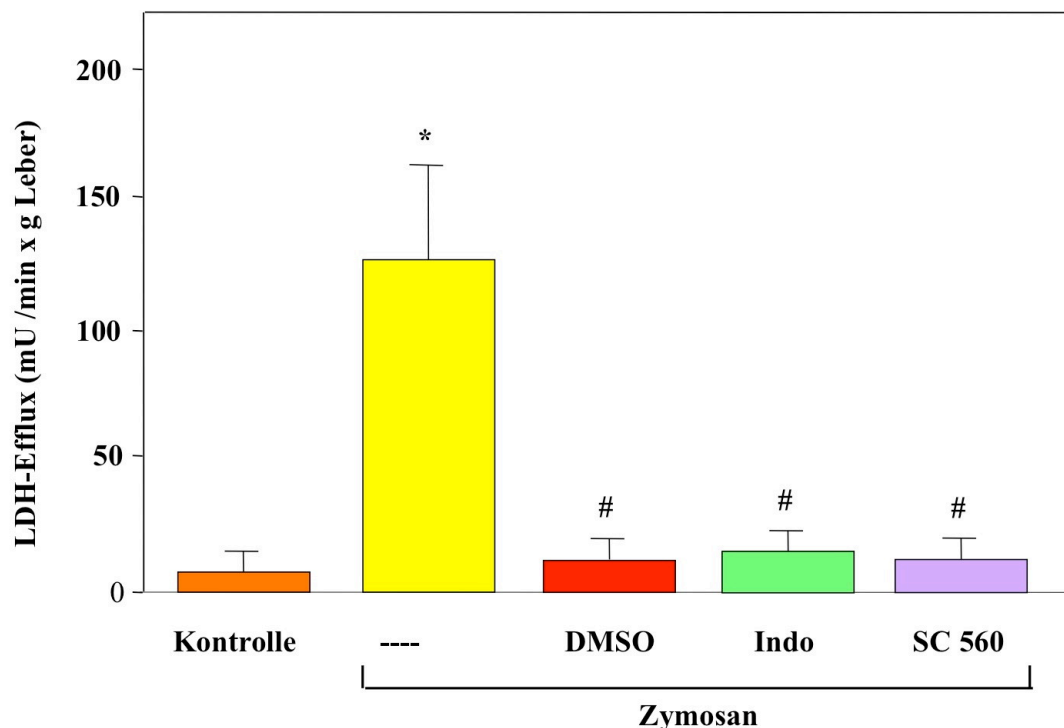


Abbildung 25: Verminderung der durch Zymosan verursachten hepatischen Zellschäden durch DMSO. Dargestellt sind die maximalen LDH- Effluxraten der Experimente der Abbildungen 11 und 12 zur 45. Minute. * $p < 0.05$ vs Kontrollen, # $p < 0.05$ vs Zymosan, $x \pm SD$.

Ein vergleichbarer protektiver Effekt wurde mit dem Lösungsvermittler DMSO beobachtet (**Abb. 25**). Diese Beobachtung ist interessant, da die DMSO- Gruppe ohne relevanten Zellschaden eine unveränderte Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung zeigte. Erwartungsgemäß wurden die sinusoidalen Prostaglandin- Effluxraten (**Tab. 4**) durch die untersuchten COX- Inhibitoren, nicht aber durch DMSO signifikant ($p < 0.05$) reduziert.

Die funktionelle Bedeutung der Prostaglandine wurde durch Experimente mit dem selektiven Thromboxan- Synthase- Inhibitor Furegrelate und dem spezifischen Thromboxan A_2 Rezeptorantagonisten BM 13.177 weiter charakterisiert.

Tabelle 4: Prostaglandin- Effluxraten (pg/min x g Leber) nach COX- Hemmung

	PGD ₂	PGF _{2α}	TxB ₂
Zymosan	7440 ± 717	701 ± 61	4218 ± 789
Zymosan + DMSO	10980 ± 1492	980 ± 131	4367 ± 382
Zymosan + Indomethacin	669 ± 180 *	194 ± 28 *	435 ± 68 *
Zymosan + SC 560	3066 ± 571 *	219 ± 42 *	<120 *

Maximale Prostaglandin- Effluxraten wurden 6 Minuten nach KS- Aktivierung durch Zymosan (150 µg/ml) mittels RIA und ELISA ermittelt. DMSO (22 mM), Indomethacin (50 µM) und SC 560 (0.4 µM) wurden gemäß der Protokolle der Abbildungen 11 und 12 verabreicht. ($x \pm SD$) (n=5/Gruppe), (* $p < 0.05$ vs Zymosan).

Die Zugabe von Furegrelate (50 µM) erfolgte von der 30.- 60. Minute. Hierdurch kam es zu einer signifikanten ($p < 0.05$) Verminderung der durch Zymosan induzierten Stimulation der sinusoidalen GSH-Ausscheidung (**Abb. 26**). Eine signifikante ($p < 0.05$) und mit Furegrelate vergleichbare Abschwächung konnte durch den Thromboxan A₂-Rezeptorantagonisten BM 13.177 (20 µM) erreicht werden (**Abb. 27**). Die nach KS-Aktivierung beobachtete Steigerung der sinusoidalen GSH-Ausscheidung scheint somit durch Thromboxan A₂ mediiert zu werden. Beide Inhibitoren/Antagonisten führten zur Reduktion des Zymosan-induzierten Zellschadens (**Abb. 28**), wobei abermals eine durch DMSO vermittelte Protektion nahe liegt.

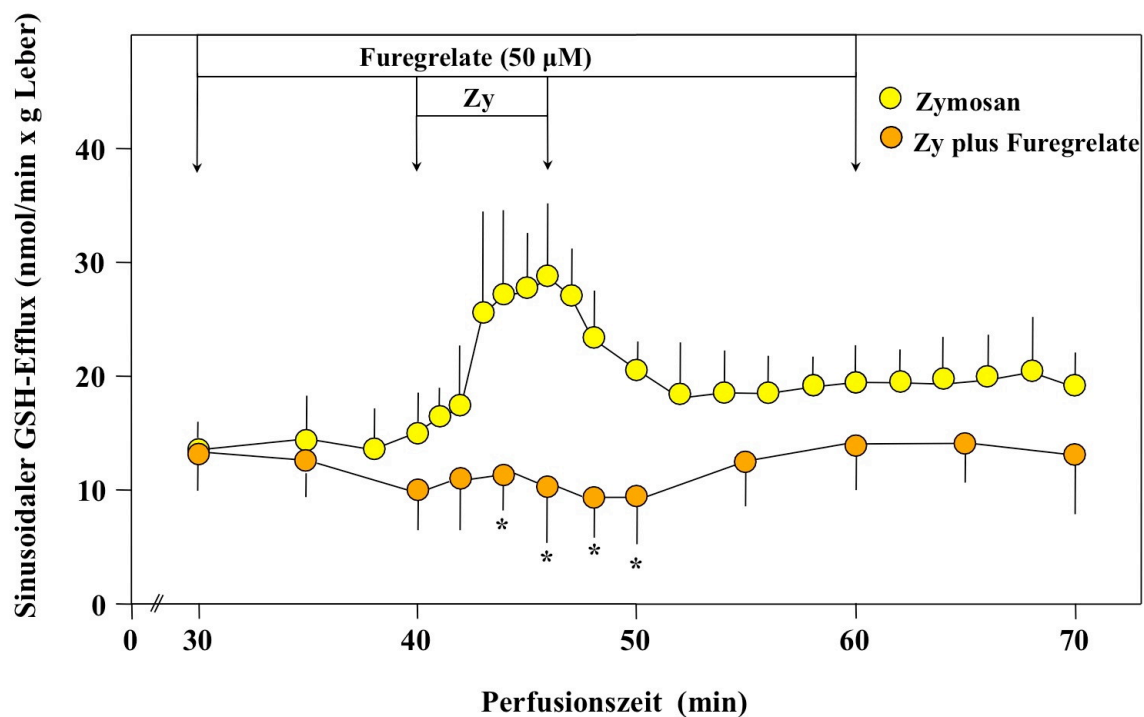


Abbildung 26: Hemmung der sinusoidalen GSH-Ausscheidung durch selektive TxA_2 – Synthase-Hemmung. Zymosan (Zy, 150 $\mu\text{g/ml}$) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion in Abwesenheit (●, $n=5$) oder Anwesenheit des spezifischen TxA_2 -Synthase-Inhibitors Furegrelate (●, 50 μM , $n=5$) zugeführt. (* $p < 0.05$ vs Zymosan, $x \pm \text{SD}$.)

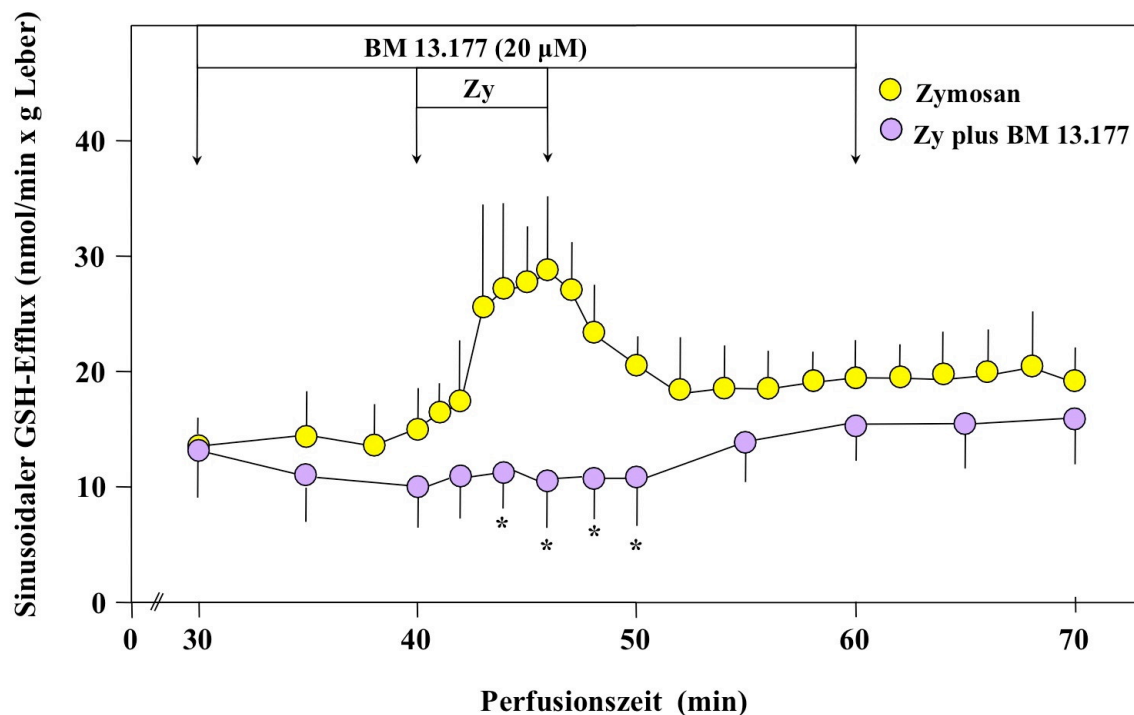


Abbildung 27: Hemmung der sinusoidalen GSH- Ausscheidung durch selektive TxA_2 – Rezeptorblockade. Zymosan (Zy, 150 μ g/ml) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion in Abwesenheit (●, n=5) oder Anwesenheit (○, 20 μ M, n= 5) des spezifischen TxA_2 – Rezeptorantagonisten BM 13.177 infundiert. (* p <0.05 vs Zymosan, $x \pm$ SD.)

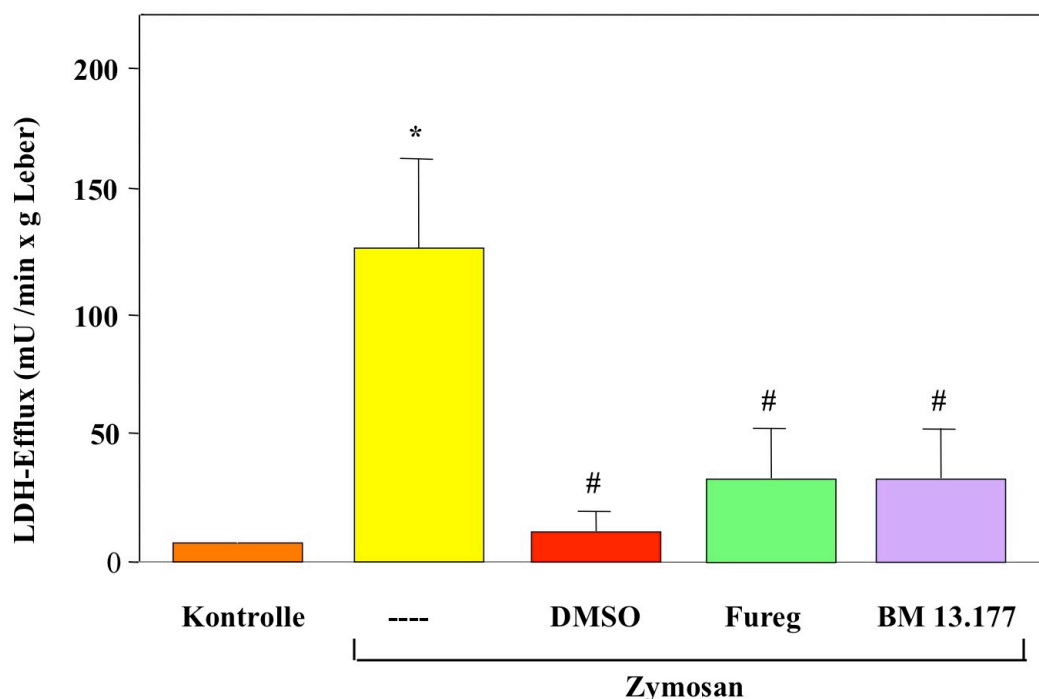


Abbildung 28: Effekt von Furegrelate und BM 13.177 auf hepatische Zellschäden durch aktivierte KS. Dargestellt sind die maximalen LDH- Effluxraten der Experimente der Abbildungen 14 und 15 zur 45. Minute, (* $p < 0.05$ vs Kontrollen), (# $p < 0.05$ vs Zymosan, $x \pm SD$).

1.16.3 Stimulation des hepatischen Glutathion- Exportes durch Infusion von Prostaglandinen

Die bisherigen Ergebnisse der Arbeit sprechen für Prostaglandine als Stimulatoren des sinusoidalen GSH- Exportes der Leber. In weiteren Experimenten wurde diese Hypothese am Modell der perfundierten Rattenleber durch direkte Zufuhr verschiedener Prostaglandine überprüft.

Abbildung 29 zeigt die signifikante ($p < 0.05$) Stimulation der sinusoidalen GSH- Freisetzung durch Infusion von $PGF_{2\alpha}$ über insgesamt 8 Minuten.

Dagegen zeigte der TxA_2 – Rezeptoragonist U-46619 keinen signifikanten Effekt auf die sinusoidalen GSH- Effluxraten (**Abb. 29**). Tendenziell nahm die GSH-Ausscheidung in der U-46619 Gruppe sogar ab.

Dieser Befund ist überraschend, da die Stimulation der GSH- Ausscheidung durch Zymosan sowohl durch TxA_2 – Synthase-Hemmung als auch durch TxA_2 – Rezeptorblockade aufgehoben wurde. Für diese Diskrepanz kaum verantwortlich erscheint eine Unterdosierung von U-46619: Durch die verwendete Konzentration kam es zu einem wesentlich stärkeren Anstieg des Pfortaderdruckes im Vergleich zu der mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ behandelten Gruppe (**Abb. 30**).

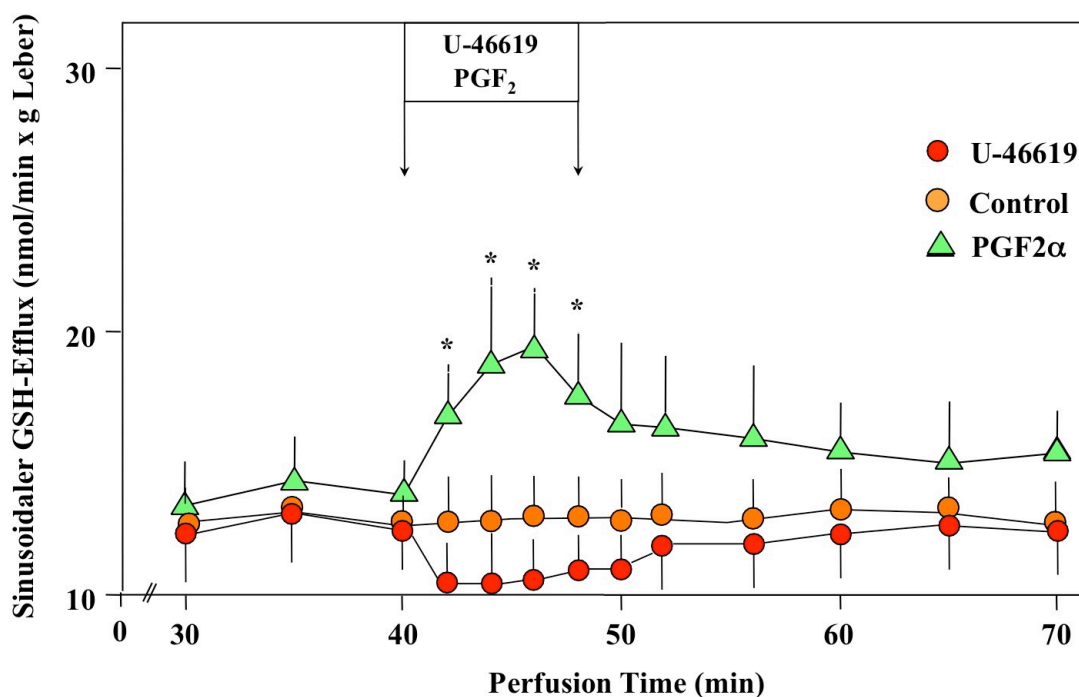


Abbildung 29: Effekt von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und U-46619 auf die sinusoidale GSH-Ausscheidung. $\text{PGF}_{2\alpha}$ (\blacktriangle , $3 \mu\text{M}$) und U-46619 (\bullet , $0.1 \mu\text{M}$) wurden von der 40. – 48. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert ($n=5/\text{Gruppe}$). $*p<0.05$ vs unbehandelte Kontrollen (\bullet , $n=5$). ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

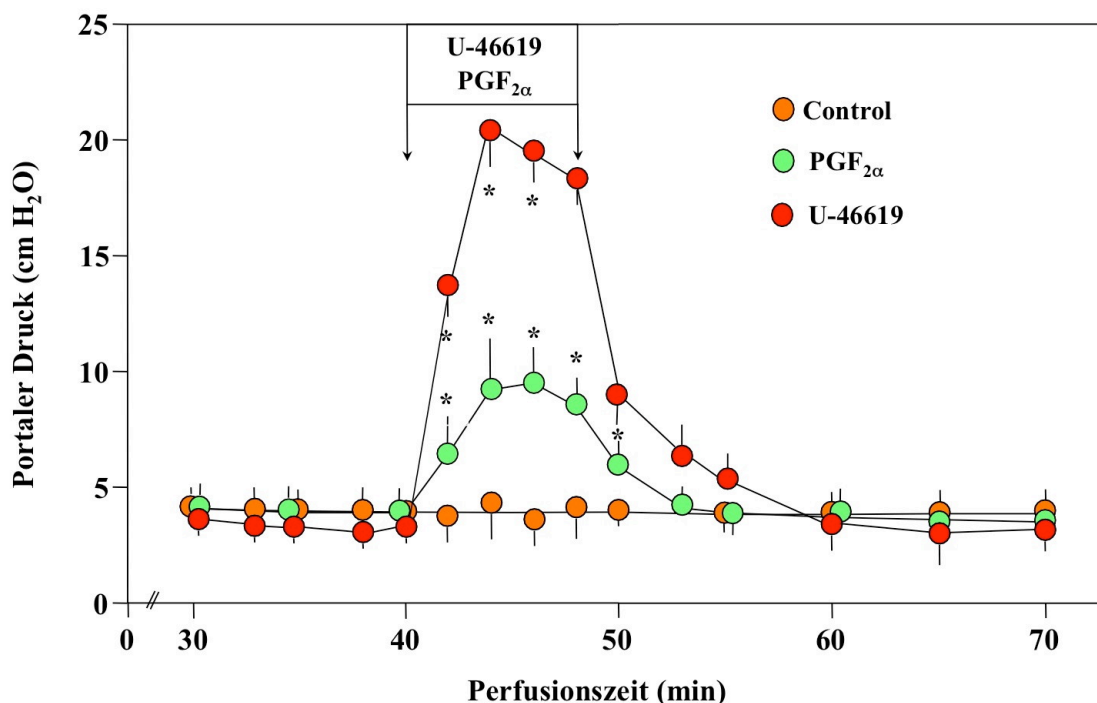


Abbildung 30: Effekt von PGF_{2α} und U-46619 auf den Pfortaderdruck.

PGF_{2α} (●, 3 μM) und U-46619 (●, 0.1 μM) wurden von der 40.–48. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (n=5/Gruppe). *p<0.05 vs unbehandelte Kontrollen (●, n=5). (x ± SD).

Die Infusion von PGD₂ führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg des sinusoidalen GSH- Exportes, wohingegen PGE₂ keine Effekte zeigte (**Abb. 31**). Während der PGD₂- Infusion kam es zudem zu einer signifikanten Erhöhung des Pfortaderdruckes (**Abb. 32**), wobei letzterer durch die Zufuhr von PGE₂ nicht beeinflusst wurde (**Abb. 32**).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente die Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung durch PGF_{2α} und PGD₂, nicht aber durch PGE₂ und den TxA₂- Agonisten U-46619. Durch die stimulierenden Prostaglandine F_{2α} und D₂ traten in den perfundierten Lebern keine Zellschäden auf, wie die in **Abbildung 33** dargestellten LDH-Effluxraten zeigen.

Dagegen entstanden signifikante Zellschäden durch die Infusion von U-46619 (**Abb. 33**), das wiederum aber keine stimulierenden Effekte auf die GSH- Ausscheidung zeigte.

Diese Ergebnisse zeigen eindrücklich, dass Zellschäden nicht notwendigerweise mit einer gesteigerten GSH- Freisetzung einhergehen bzw. eine Stimulation der hepatischen GSH- Freisetzung durch Prostaglandine ohne begleitende Zellschäden möglich ist.

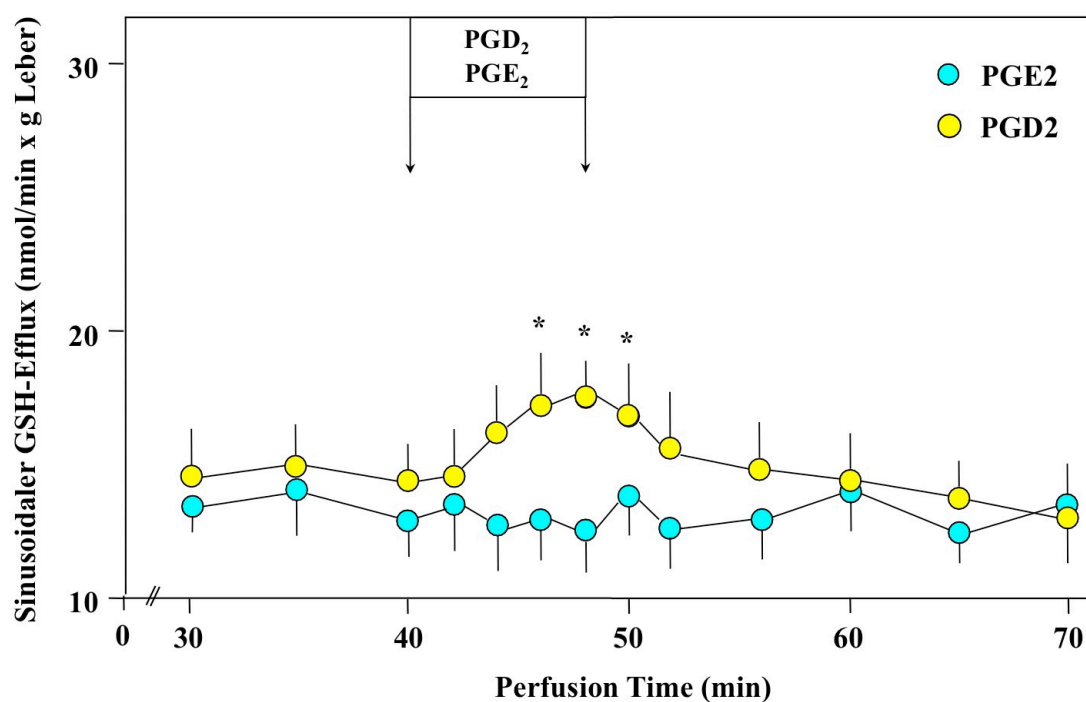


Abbildung 31: Effekt von PGD₂ und PGE₂ auf die sinusoidale GSH-Ausscheidung. PGD₂ (●, 3 μM) und PGE₂ (●, 3 μM) wurden von der 40. – 48. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (n=5/Gruppe). (*p<0.05 vs PGE₂, x ± SD).

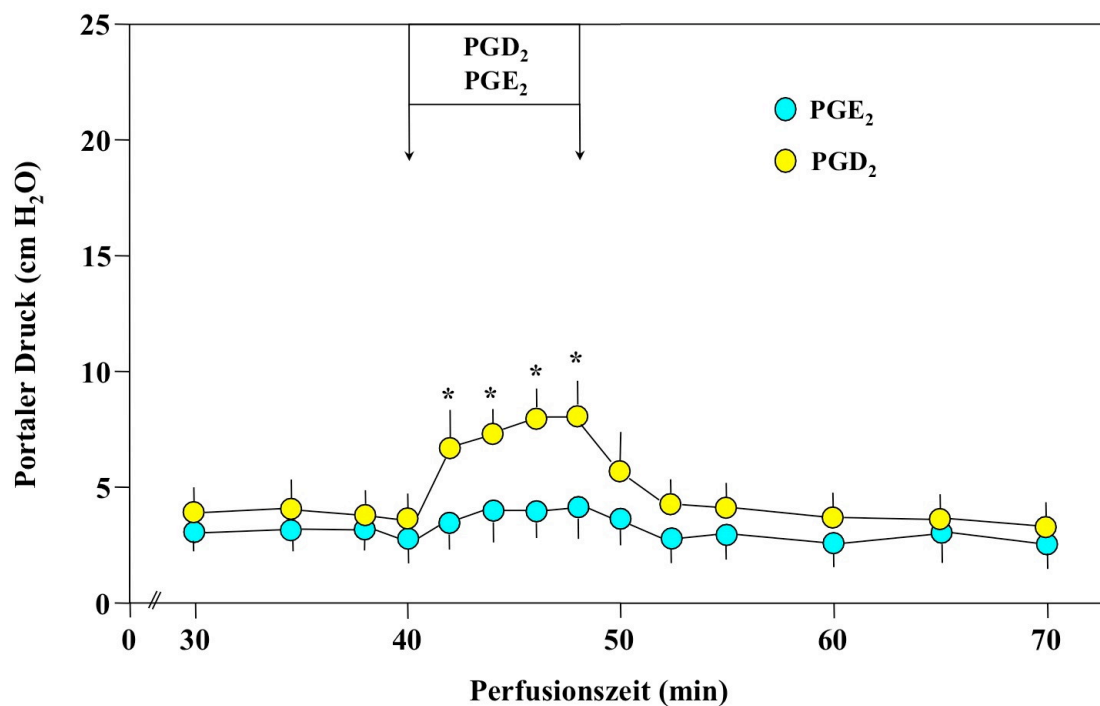


Abbildung 32: Effekt von PGD₂ und PGE₂ auf den Pfortaderdruck. PGD₂ (●, 3 μM) und PGE₂ (○, 3 μM) wurden von der 40. – 48. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (n=5/Gruppe). (*p<0.05 vs PGE₂. $\bar{x} \pm SD$).

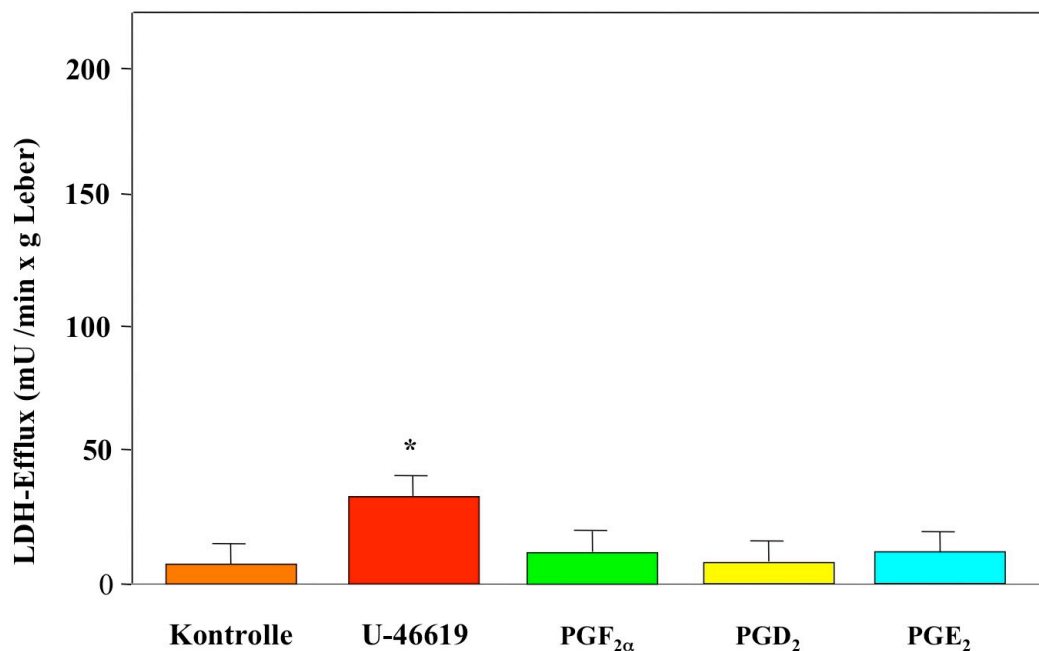


Abbildung 33: Hepatische Zellschäden nach Infusion von Prostaglandinen. Dargestellt sind die maximalen LDH- Effluxraten der Experimente der Abbildungen 17 bis 20 zur 48. Minute. (* $p < 0.05$ vs Kontrollen, $x \pm SD$).

1.17 Beteiligung von Leukotrienen bei der Stimulation der hepatischen GSH-Ausscheidung nach KS- Aktivierung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine durch Prostaglandine mediierte Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung nach Aktivierung der KS. Unklar bleibt, ob Prostaglandine diesen Effekt allein oder innerhalb eines Netzwerkes zusammen mit anderen Entzündungsmediatoren vermitteln. Zur Identifizierung möglicher Netzwerkkomponenten wurde in weiteren Experimenten die Bedeutung der von aktivierten KS gebildeten Cys-Leukotriene untersucht.

Hierzu wurde die Leukotrienbiosynthese auf der Stufe der 5-Lipoxygenase (5-LPO) durch den spezifischen Inhibitor MK 886 inhibiert bzw. Cys-LT₁-Rezeptor vermittelte Effekte von LTC₄ und LTD₄ durch den spezifischen Cys-LT₁-Antagonisten LY171883 blockiert (**Abb. 34**).

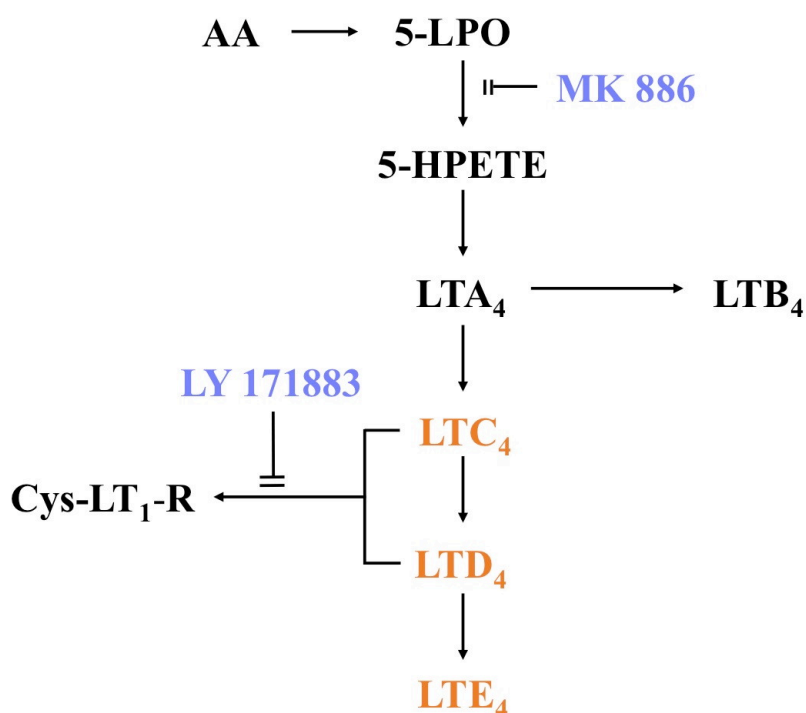


Abbildung 34: Leukotriene: Synthesehemmer und Rezeptorenblocker. AA, Arachidonsäure; 5-HPETE, 5-Hydroperoxy-6,8,11,14-Eicosatetraensäure; 5-LPO, 5-Lipoxygenase; LT, Leukotrien. Weitere Beschreibungen im Text.

Die Hemmung der 5-LPO durch MK 886 (4 µM) führte zu einer Abschwächung der maximalen GSH-Effluxraten nach Aktivierung der KS durch Zymosan (**Abb. 35**). Ferner wurde durch 5-LPO-Hemmung der langanhaltende Anstieg der GSH-Freisetzung signifikant ($p < 0.05$) vermindert (**Abb. 35**).

Ähnliche Effekte auf die initiale und langanhaltende Erhöhung der GSH-Ausscheidung wurden mit dem Cys-LT₁-Antagonisten LY171883 (20 µM) beobachtet (**Abb. 36**). Die Zunahme der sinusoidalen LDH- Freisetzung nach KS-Aktivierung wurde durch den 5-LPO Inhibitor signifikant vermindert, wohingegen der Zellschaden durch den Rezeptorantagonisten nicht beeinflusst wurde (**Abb. 37**).

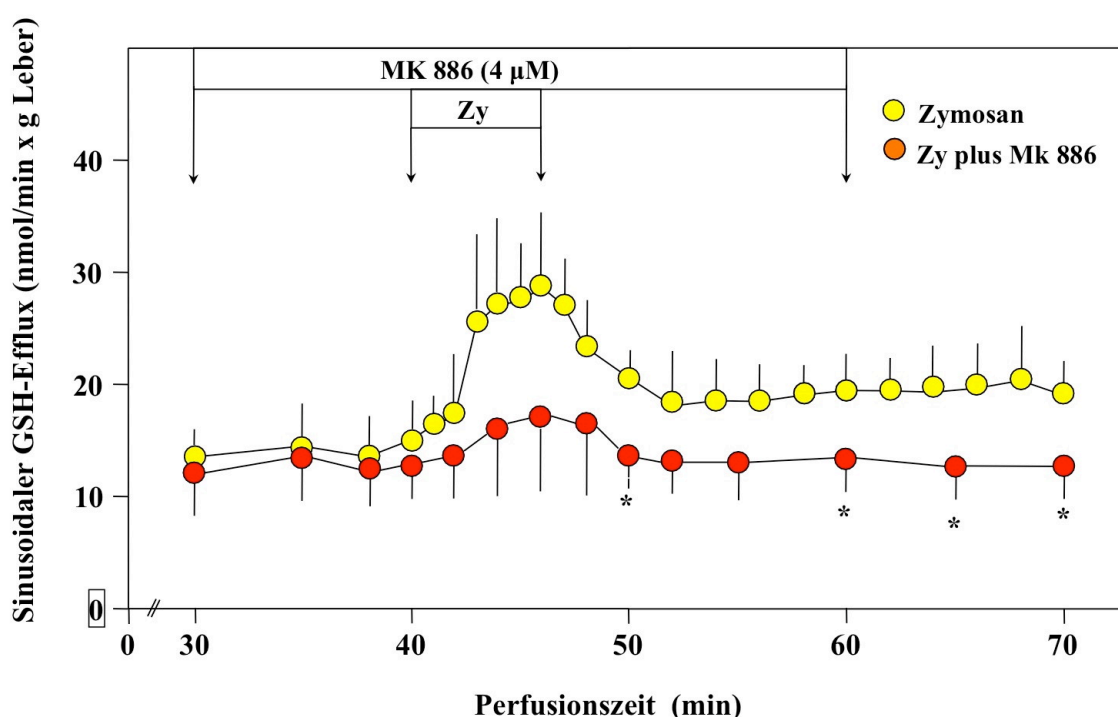


Abbildung 35: Hemmung der sinusoidalen GSH- Ausscheidung durch 5-LPO-Inhibition. Zymosan (Zy, 150 µg/ml) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion in Abwesenheit (●, n=5) oder Anwesenheit des spezifischen 5-LPO-Inhibitors MK 886 (●, 4 µM, n= 5) infundiert. *p<0.05 vs Zymosan, x ± SD.

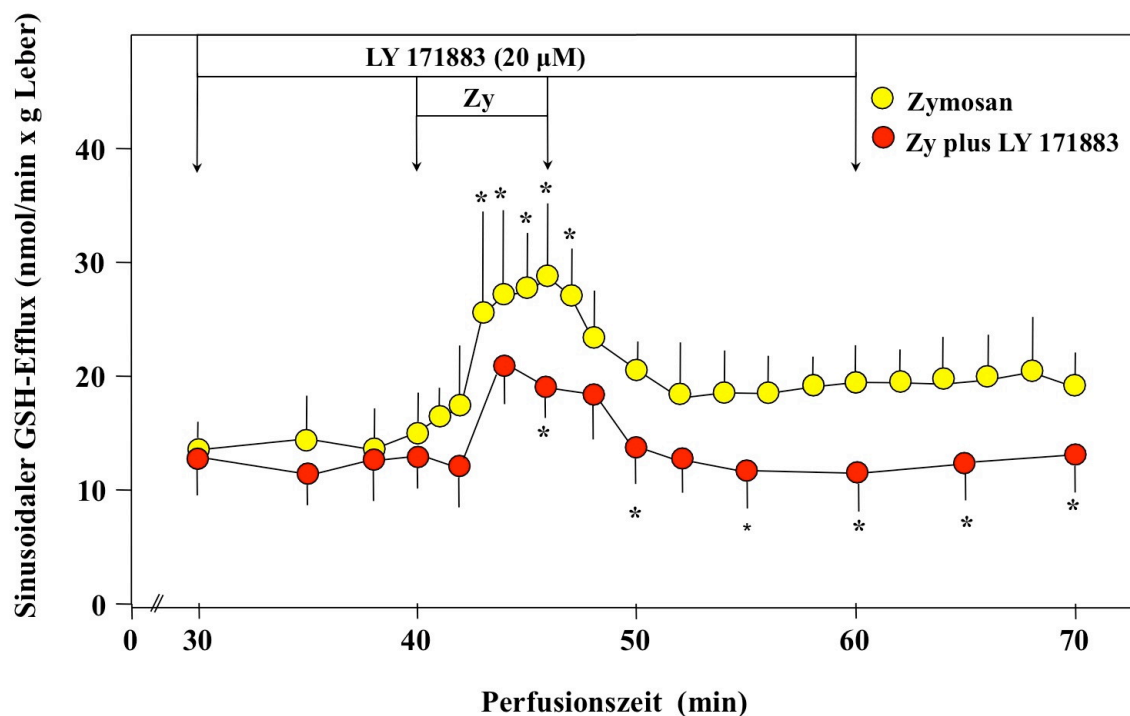


Abbildung 36: Hemmung der sinusoidalen GSH- Ausscheidung durch Cys-LT₁- Rezeptorblockade. Zymosan (Zy, 150 μg/ml) wurde von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion in Abwesenheit (● , n=5) oder Anwesenheit des spezifischen Cys-LT₁- Rezeptorblockers LY 171883 (● , 20 μM, n= 5) infundiert. *p<0.05 vs Zymosan, $\bar{x} \pm SD$.

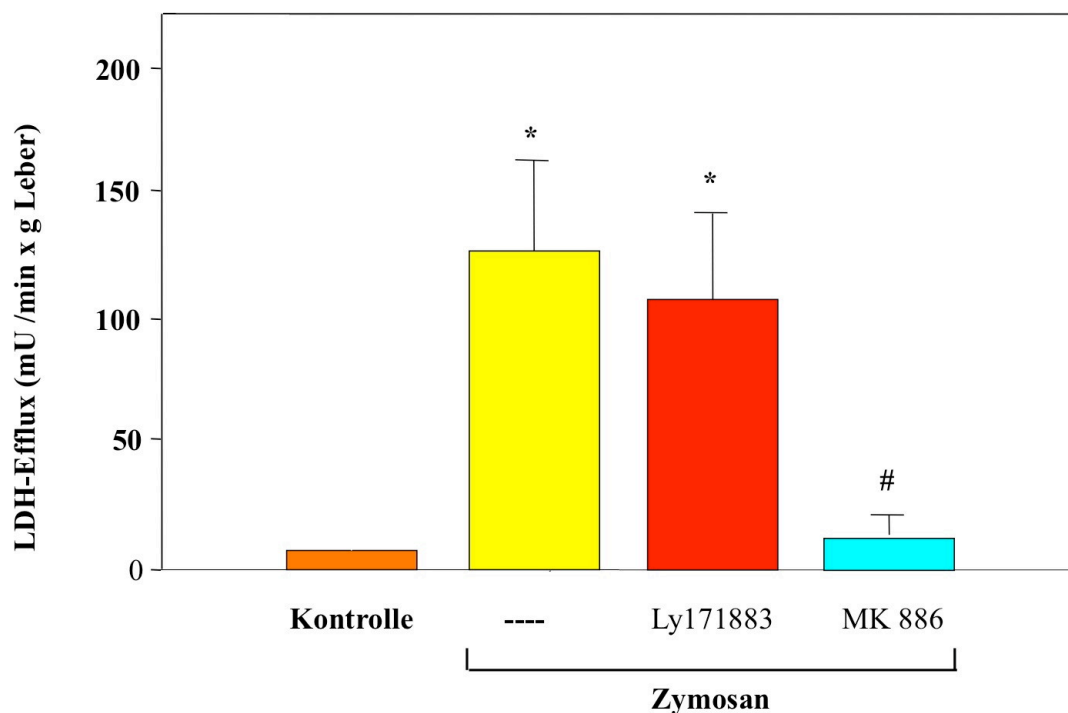


Abbildung 37: Effekt von MK 886 und Ly 171883 auf hepatische Zellschäden durch aktivierte KS. Dargestellt sind die maximalen LDH- Effluxraten der Experimente der Abbildungen 23 und 24 zur 45. Minute. * $p < 0.05$ vs Kontrollen, # $p < 0.05$ vs Zymosan, $x \pm SD$.

Diese Ergebnisse zeigen die Beteiligung von Cysteinyl-Leukotrienen und insbesondere die Rolle des Cys-LT₁- Rezeptors bei der Stimulation des sinusoidalen GSH- Exportes durch aktivierte KS. Hiefür sprechen auch die Ergebnisse von Perfusionsexperimenten mit direkter Zufuhr von LTC₄ über die Pfortaderkanüle.

Wie in **Abb. 38** gezeigt, wurde die sinusoidale GSH- Ausscheidung während der Infusion von LTC₄ nicht beeinflusst. Erst nach Beendigung der LTC₄ -Infusion kam es zu einem signifikanten ($p < 0.05$) und lang anhaltenden Anstieg der GSH-Freisetzung im Gegensatz zur maximalen Stimulation der GSH- Effluxraten während der Zufuhr der Prostaglandine F_{2α} und D₂ (**Abb. 39 und 41**).

Cysteinyl- Leukotriene induzieren somit eine lang anhaltende Stimulation der GSH-Freisetzung in Übereinstimmung mit den beobachteten inhibitorischen Effekten einer 5-LPO-Hemmung und LT_1 -Rezeptorblockade im Falle einer KS-Aktivierung (**Abb. 35 und 36**).

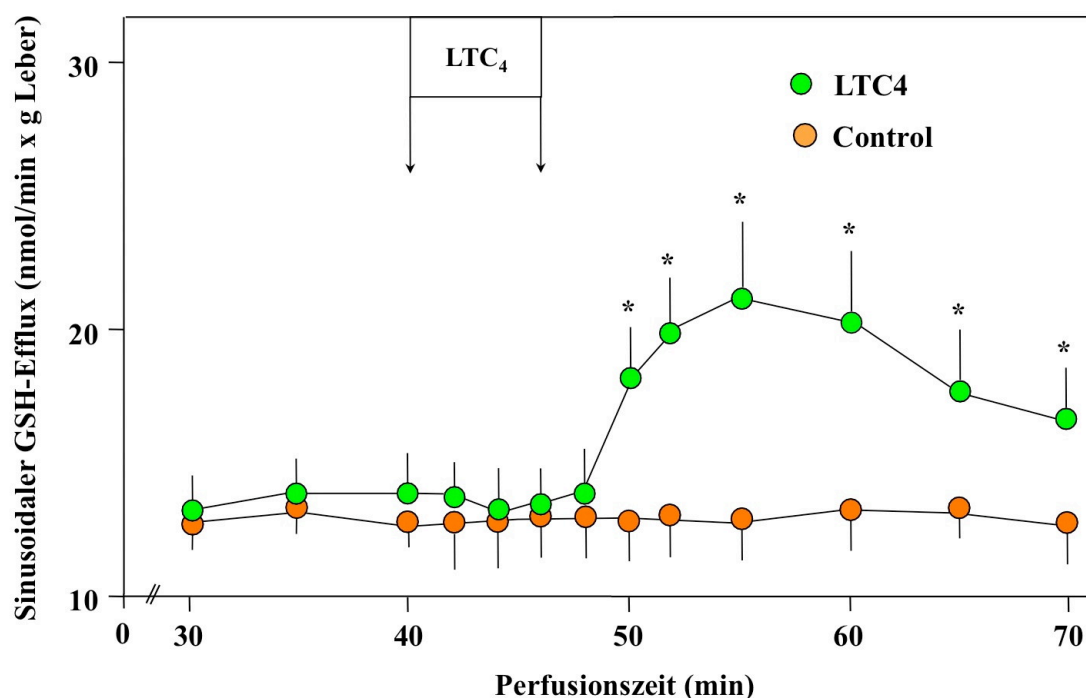


Abbildung 38: Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung durch LTC_4 . LTC_4 (20 nM) wurde von der 40. - 48. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (●, n=5). * $p < 0.05$ vs unbehandelte Kontrollen (●, n=5), $x \pm SD$.

Während der Zufuhr von LTC_4 kam es zu einer signifikanten ($p < 0.05$) Steigerung der LDH-Freisetzung in das Leberperfusat (**Abb. 39**). In der Phase der gesteigerten GSH- Ausscheidung waren dagegen keine signifikanten Zellschäden nachweisbar. Eine durch Zellschäden bedingte Stimulation der GSH- Ausscheidung ist deshalb unwahrscheinlich, zumal mit dem TxA_2 - Agonisten U-46619 ohne Steigerung der GSH- Freisetzung nahezu identische LDH- Effluxraten beobachtet wurden (**Abb. 29 und 33**).

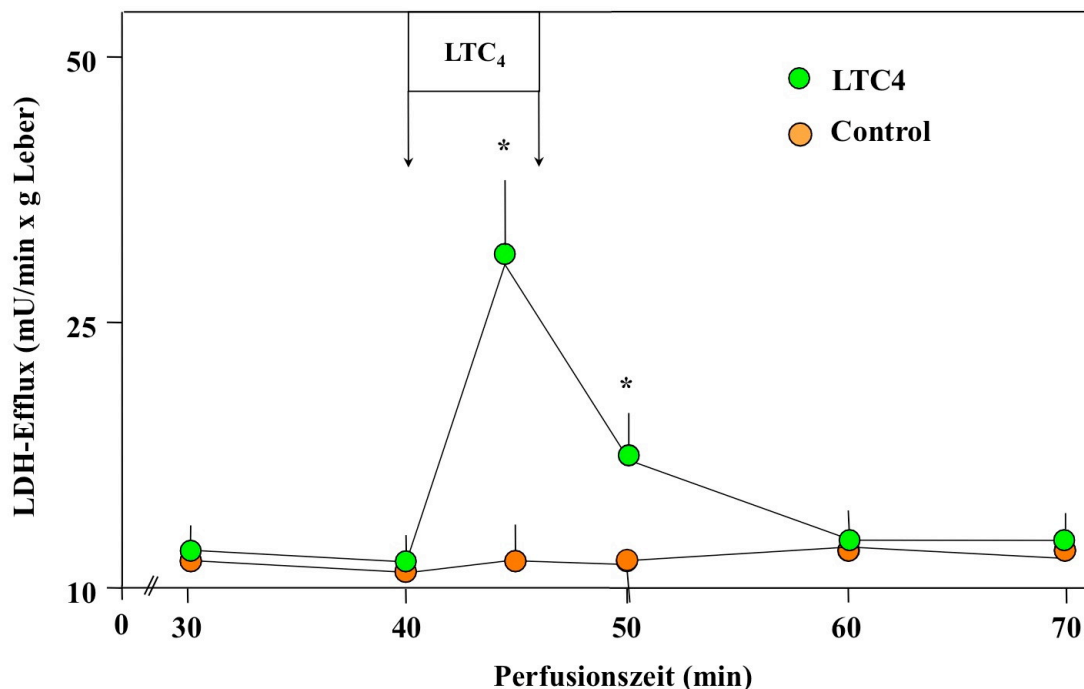


Abbildung 39: Hepatische Zellschädigung durch LTC₄. LTC₄ (20 nM) wurde von der 40. - 48. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert (● , n=5). *p<0.05 vs unbehandelte Kontrollen (● , n=5), $\bar{x} \pm SD$.

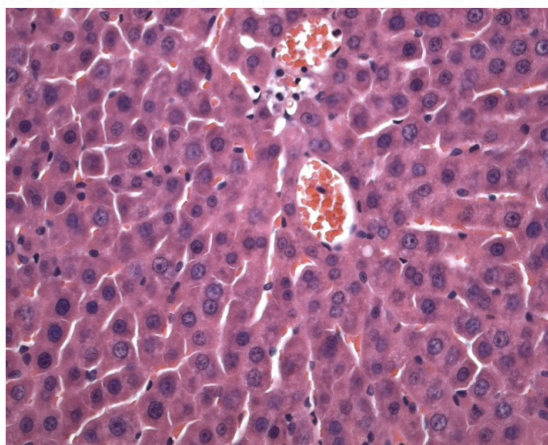
1.18 Gestörte sinusoidale GSH- Ausscheidung in Fettlebern homozygoter Zucker-Ratten

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Steigerung des sinusoidalen GSH- Exportes der Leber nach KS-Aktivierung durch Entzündungsmediatoren aus der Familie der Eicosanoide. Im Falle systemischer Infektionen könnte dieser bislang nicht bekannte Mechanismus einen wesentlichen Beitrag zur GSH-Versorgung entzündeter Gewebe mit gesteigerter Produktion von Sauerstoffradikalen leisten. Erkrankungen der Leber könnten diesen Mechanismus empfindlich stören.

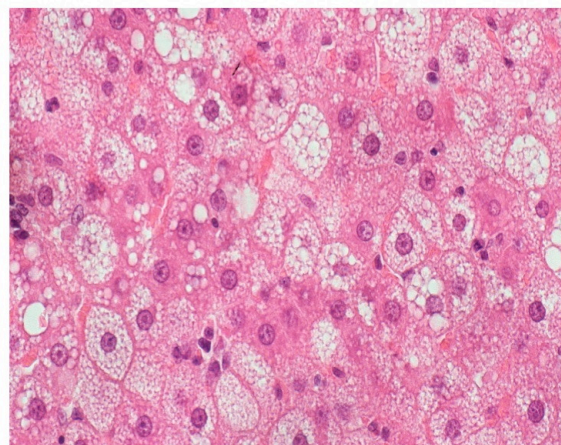
Gegenstand der folgenden Untersuchungen war aus diesem Grund die Charakterisierung der sinusoidalen GSH- Ausscheidung in erkrankten Lebern unter Kontrollbedingungen sowie nach Aktivierung der KS.

In einem ersten experimentellen Ansatz wurden die Lebern homozygoter Zucker-Ratten als etabliertes Modell der weit verbreiteten, durch Überernährung induzierten Fettleber mit begleitendem metabolischem Syndrom untersucht.

Wie in **Abbildung 40** eindrücklich gezeigt, war in den beträchtlich vergrößerten Lebern männlicher homozygoter Zucker-Ratten im Alter von ca. 12 Wochen (**Tab. 5**) eine etwa 50%-ige mikrovesikuläre Verfettung der Hepatozyten nachweisbar. Lebern altersgleicher Sprague-Dawley-Ratten zeigten dagegen normale histologische Befunde (**Abb. 40**).



SD Ratte



Zucker Ratte

H&E, 400x

Abbildung 40: Mikrovesikuläre Verfettung der Lebern homozygoter Zucker-Ratten.

Tabelle 5 : Charakterisierung altersgleicher Sprague-Dawley- und Zucker-Ratten

	Sprague-Dawley	Zucker
Körpergewicht (g)	273 ± 33	482 ± 42 *
Lebergewicht (g)	12.0 ± 1.5	18.5 ± 2.7 *
ALT (U/L)	49 ± 8	90 ± 12 *
Triglyzeride (mg/dl)	98 ± 12	380 ± 42 *
Glucose (mg/dl)	175 ± 19	430 ± 30 *

Serumproben zur Bestimmung von ALT, Glucose und Triglyzeriden wurden am anästhesierten Tier durch Punktion der Vena cava inferior gewonnen. $x \pm SD$ (n=5/Gruppe), ($p < 0.05$ vs Sprague- Dawley).*

Hiermit vereinbar, fanden sich bei Zucker-Ratten signifikant höhere Serum-ALT-Werte (**Tab. 5**). Ferner bestand bei den nicht-gefasteten adipösen Zucker-Ratten eine diabetische Stoffwechsellage sowie eine ausgeprägte Hypertriglyzeridämie (**Tab. 5**).

Bei der Perfusion der steatotischen Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer (**Abb. 41**) fielen signifikant ($p < 0.05$) niedrigere sinusoidale GSH- Effluxraten im Vergleich zu normalen Lebern männlicher Sprague-Dawley- Ratten (**Abb. 41**) auf.

Wie in **Abbildung 42** dargestellt, war dieser Unterschied nicht auf Änderungen der intrazellulären GSH- Homöostase zurückzuführen: Normale und steatotische Lebern zeigten vergleichbare hepatische GSH- Gehalte.

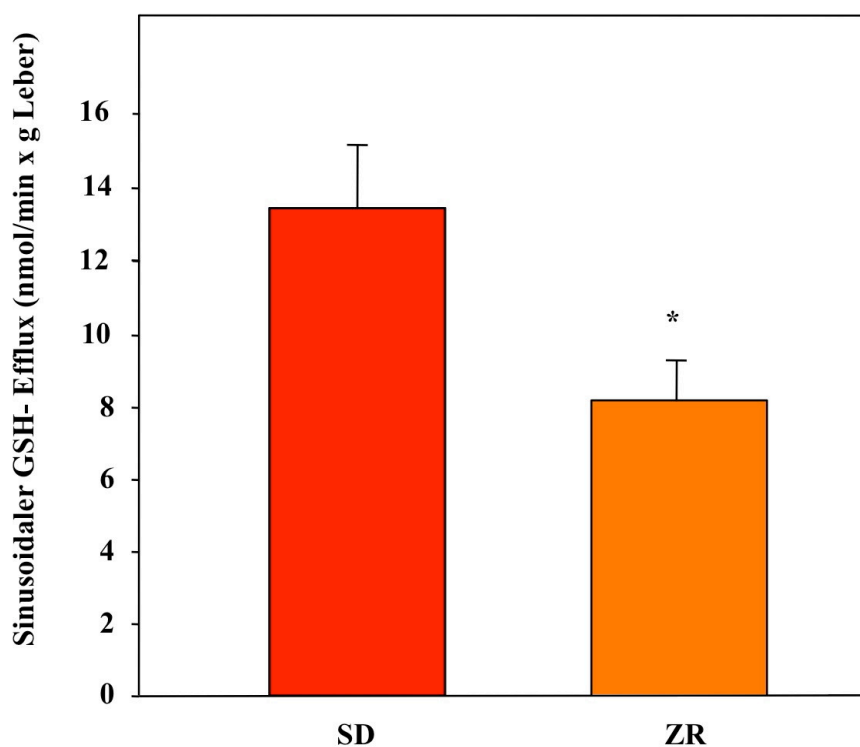


Abbildung 41: Verminderte GSH- Ausscheidung verfetteter Lebern.

Dargestellt sind GSH- Effluxraten 30 Minuten nach Beginn der Perfusion der Lebern altersgleicher Sprague-Dawley-(SD) und Zucker-Ratten (ZR, je $n=5$). (* $p < 0.05$, $x \pm$ SD).

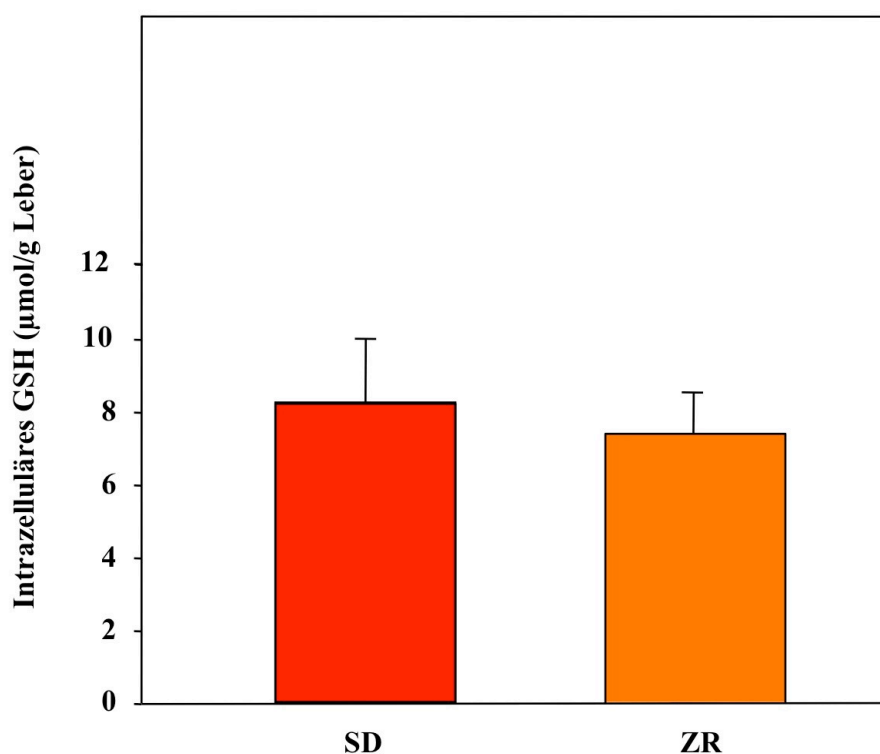


Abbildung 42: Intrazelluläre GSH- Gehalte normaler und steatotischer Lebern. Dargestellt sind intrazelluläre GSH-Gehalte, die 30 Minuten nach Beginn der Perfusion der Lebern altersgleicher Sprague-Dawley- (SD) und Zucker-Ratten (ZR), (je n=5) gewonnen wurden. (* $p < 0.05$, $\bar{x} \pm SD$).

Interessant war ferner der in Fettlebern wesentlich geringere Anstieg der sinusoidalen GSH- Ausscheidung nach Aktivierung der KS durch Zymosan (**Abb. 43**). Während die GSH- Ausscheidung der normalen Lebern um $15 \text{ nmol/min} \times \text{g}$ Leber zunahm, betrug die Mehrausscheidung der verfetteten Lebern maximal $2.5 \text{ nmol/min} \times \text{g}$ Leber.

Bei der Perfusion der normalen Rattenlebern kam es, wie bereits an anderer Stelle beschrieben, zu einem Anstieg der sinusoidalen LDH- Freisetzung von basal 3.6 ± 1.4 auf maximal $130 \pm 45 \text{ mU/min} \times \text{g}$ Leber 5 Minuten nach Aktivierung der Kupffer Zellen.

Vergleichbare basale (2.9 ± 1.1 mU/min x g Leber) und maximale LDH –Effluxraten (103 ± 23 mU/min x g Leber) zu gleichen Zeitpunkten wurden bei der Perfusion der steatotischen Lebern beobachtet.

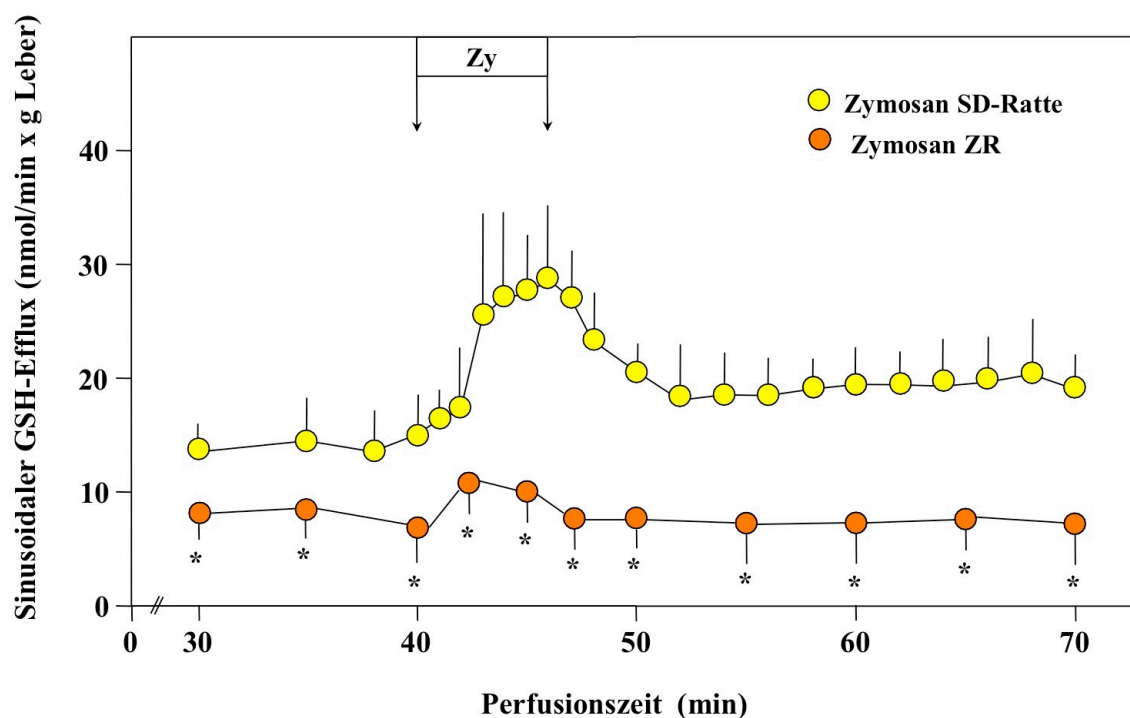


Abbildung 43: Minimale Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung nach KS- Aktivierung in steatotischen Lebern homozygoter Zucker-Ratten. Zymosan (Zy, 150 μ g/ml) wurde zur Aktivierung der KS von der 40. - 46. Minute nach Beginn der Perfusion infundiert. Im Vergleich zu normalen Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten (\circ , n=5) antworteten steatotische Lebern altersgleicher homozygoter Zucker-Ratten (\bullet , n=5) mit einem minimalen Anstieg der sinusoidalen GSH- Ausscheidung nach KS- Aktivierung. * $p < 0.05$, $x \pm SD$.

Die Bestimmung von TxB_2 und PGF_2 – im effluenten Perfusat der steatotischen Lebern ergab für beide Prostaglandine eine massive ($p < 0.05$) Stimulation ihrer sinusoidalen Effluxraten nach Aktivierung der KS (**Abb. 44 und 45**). Im Vergleich zur Gruppe der Sprague-Dawley Ratten waren die Prostaglandin- Effluxraten der steatotischen Lebern homozygoter Zucker-Ratten jedoch um ca. 60 % vermindert ($p < 0.05$).

Diese Ergebnisse zeigen eine in steatotischen Lebern homozygoter Zucker-Ratten verminderte Prostaglandin- Synthese nach KS- Aktivierung als mögliche Ursache der geringen Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung.

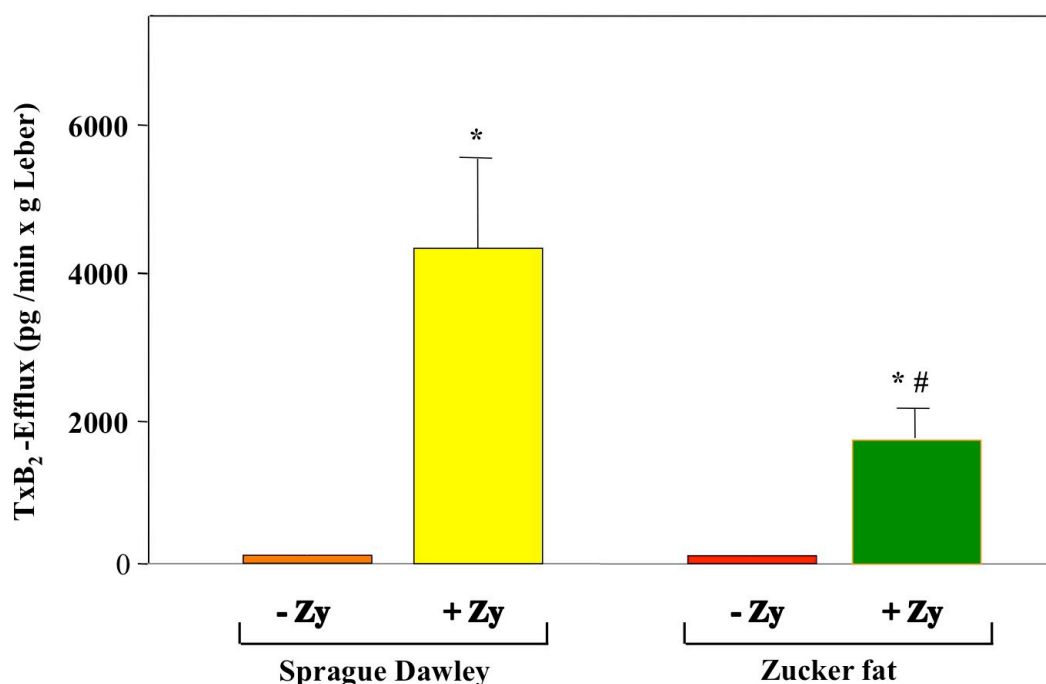


Abbildung 44: Stimulation der sinusoidalen TxB_2 - Effluxraten normaler und steatotischer Lebern durch aktivierte KS. Dargestellt sind die TxB_2 - Effluxraten der Versuche der Abb. 31 zur 40. Minute vor der Gabe von Zymosan (-Zy) sowie zur 46. Minute am Ende der Infusion von Zymosan (+Zy). * $p < 0.05$ vs -Zy; # $p < 0.05$ vs +Zy/SD Ratten. $x \pm \text{SD}$, $n=5/\text{Gruppe}$.

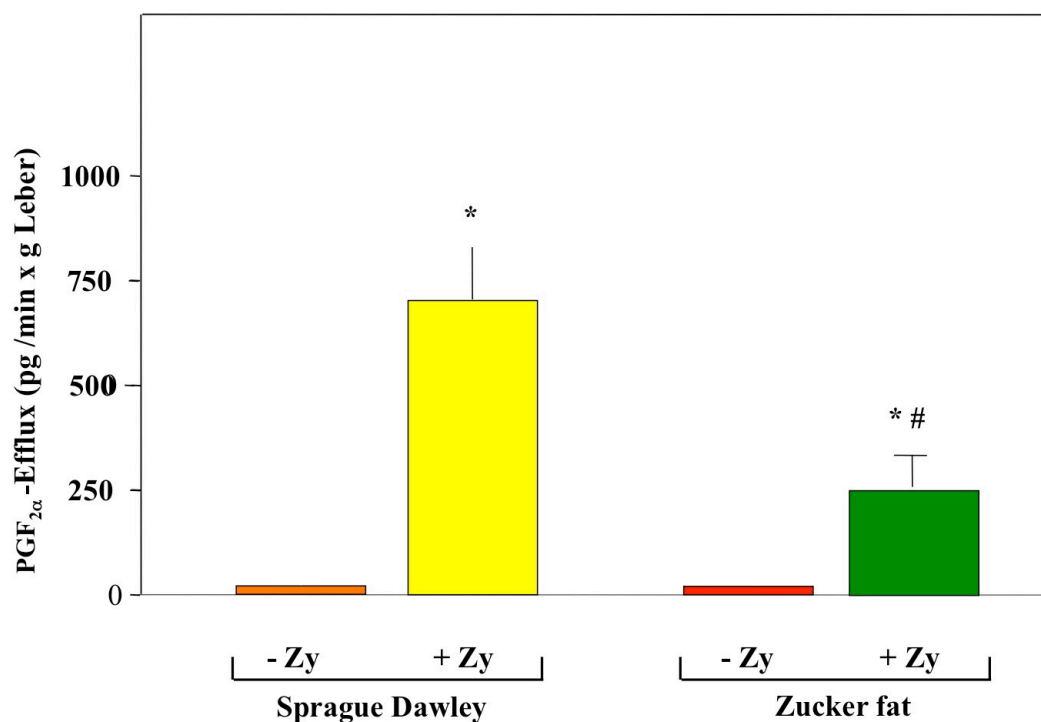


Abbildung 45: Stimulation der sinusoidalen $PGF_{2\alpha}$ - Effluxraten normaler und steatotischer Lebern durch aktivierte KS.

Dargestellt sind die $PGF_{2\alpha}$ - Effluxraten der Versuche der Abb. 31 zur 40. Minute vor der Gabe von Zymosan (-Zy) sowie zur 46. Minute am Ende der Infusion von Zymosan (+Zy). * $p < 0.05$ vs -Zy; # $p < 0.05$ vs +Zy/SD Ratten. $x \pm SD$, $n=5$ /Gruppe.

Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der hepatische GSH-Transport durch Kupffer-Zellen reguliert wird und wenn ja, welche Faktoren an dieser Regulation maßgeblich beteiligt sind.

Als wesentliche Ergebnisse bleiben festzuhalten:

- Die Aktivierung von Kupffer-Zellen durch Zymosan führt zu einer massiven Steigerung der sinusoidalen GSH-Freisetzung um mehr als 100 %, an die sich eine lang anhaltende Erhöhung der GSH-Effluxraten um ca. 40 % anschließt.
- Die massive Zunahme der sinusoidalen GSH-Ausscheidung ist weder durch cholestatische Effekte noch durch Zellschäden bedingt. Verantwortlich ist vielmehr eine Stimulation des hepatozellulären GSH-Exportes durch eine Zell-Zell-Interaktion zwischen Kupffer-Zellen und Hepatozyten.
- Die nach KS- Aktivierung beobachtete Steigerung der sinusoidalen GSH-Freisetzung wird durch ein komplexes Netzwerk aus Prostaglandinen und Cys-Leukotrienen vermittelt.
- An der kurzzeitigen, maximalen Steigerung der sinusoidalen GSH- Ausscheidung scheinen sowohl Thromboxan A₂ als auch PGF_{2α} und PGD₂ beteiligt zu sein, während PGE₂ keine Bedeutung besitzt.
- Die langanhaltende Stimulation des GSH- Effluxes wird dagegen durch Cysteinyl-Leukotriene vermittelt, wobei hier der Cys-LT₁- Rezeptor eine zentrale Rolle einnimmt.
- In steatotischen Lebern ist der intrazelluläre GSH-Gehalt nahezu identisch mit dem in gesunden Lebern. Im Vergleich zeigte sich jedoch in den steatotischen Lebern nach Aktivierung der KS durch Zymosan eine gestörte sinusoidale GSH-Ausscheidung.

1.19 Stimulation des sinusoidalen Glutathion- Efflux durch aktivierte Kupffer-Zellen

Aus diversen Vorarbeiten ist bekannt, dass systemische Entzündungen und insbesondere Endotoxinämien von einer massiven Zunahme der GSH-Ausscheidung der Leber begleitet werden (Bilzer 1993,1999, Jaeschke 1992, DeLeve 1991, Hafenrichter 1994).

Da bei systemischen Infektionen Kupffer-Zellen der Leber durch bakterielle Endotoxine oder β -Glukane aktiviert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese einer durch Kupffer-Zellen medierten Regulation des hepatischen Glutathion- Transports aufgestellt.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Experimente am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber mit einem Leukozyten- freien Perfusionspuffer durchgeführt. Dieses Modell erlaubt die Untersuchung von KS- Effekten in der Leber ohne störende Einflüsse extrahepatischer Faktoren (Bilzer 1997).

Hierzu wurden Lebern mit β -Glukan-reichen Zymosanpartikeln perfundiert, die zu einer selektiven Aktivierung der KS führen (Dieter 1987, Bilzer 1999).

Während der Perfusion mit Zymosan kam es zu einem Anstieg der sinusoidalen GSH- Freisetzung um mehr als 100%, der sich nach Beendigung der Zymosangabe eine lang anhaltende Erhöhung der GSH- Effluxraten um ca. 40 % anschloß.

Gleichzeitig konnte eine mehrfache Steigerung der LDH-Freisetzung als Hinweis auf eine Leberzellschädigung durch aktivierte Kupffer Zellen beobachtet werden.

Zur Klärung der Frage, ob die durch Zymosan induzierte Stimulation der GSH-Ausscheidung und die beobachtete Zellschädigung durch KS mediiert wird, wurden KS durch eine 2-tägige Vorbehandlung der Tiere mit Gadoliniumchlorid funktionell inaktiviert (Pearson 1996, Jaeschke 1991, Hardonk 1992, Schauer 2001). Tatsächlich führte die Inaktivierung der KS zu einer vollständigen Hemmung der durch Zymosan stimulierten GSH- Freisetzung. Auch der durch Zymosan induzierte Zellschaden wurde durch die Vorbehandlung mit $GdCl_3$ nahezu vollständig aufgehoben.

Eine ausschließlich durch Cholestase bedingte Erhöhung der sinusoidale GSH-Ausscheidung konnte durch die durchgeführten Experimente ausgeschlossen werden. Während die biliäre GSH-Ausscheidung nach KS-Aktivierung um ca. 1 nmol/min x g Leber abnahm, kam es zeitgleich zu einer Erhöhung der sinusoidalen GSH-Freisetzung um ca. 15 nmol/min x g Leber. Ebenfalls konnten die nach Zymosanzufuhr beobachteten Zellschäden als Ursache einer vermehrten GSH-Freisetzung ausgeschlossen werden. Die Infusion des Hydroxylradikal-Fängers DMSO führte zu einer vollständigen Hemmung Zymosan-induzierter Zellschäden, während die gesteigerte sinusoidale GSH-Freisetzung hiervon unbeeinflusst blieb.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse muß eine Stimulation hepatozellulärer GSH-Exportmechanismen als Folge einer Zell-Zell-Interaktion zwischen Kupffer-Zellen und Hepatozyten für die vermehrte sinusoidale GSH-Freisetzung nach KS-Aktivierung verantwortlich sein.

Die hieran beteiligten Mechanismen wurden in weiteren Experimenten identifiziert.

1.20 Mechanismen der Zell-Zell-Interaktion zwischen Kupffer Zellen und Hepatozyten

1.20.1 Bedeutung von Cyclooxygenase-I

Die nach KS-Aktivierung beobachtete, maximale Erhöhung der sinusoidalen Effluxraten von GSH konnte durch den Cyclooxygenase- Inhibitor Indomethacin vollständig gehemmt werden. Die langanhaltende Steigerung der Glutathion-Freisetzung wurde durch Indomethacin hingegen nicht beeinflusst, was den Schluss zulässt, dass die GSH-Freisetzung nach KS- Aktivierung von Cyclooxygenase-abhängigen und Cyclooxygenase- unabhängigen Mechanismen mediiert wird.

Diese Hypothese wurde im nächsten Schritt durch Bestimmung der Prostaglandine Thromboxan A₂, Prostaglandin D₂ und Prostaglandin F_{2α} verifiziert. Noch während der Perfusion von Zymosan kam es zu einem massiven Anstieg der sinusoidalen Prostaglandin- Effluxraten, wobei die Ausscheidung ins Leberperfusat ihr Maximum jeweils zum Zeitpunkt der maximalen GSH- Ausscheidung erreichte.

Diese Beobachtung stützt frühere Arbeiten, welche eine massive Zunahme der Prostaglandin-Bildung nach Zymosan-Exposition isolierter Kupffer-Zellen beschrieben (Birmelin 1984). Ferner konnten wir zeigen, dass der hepatische Prostaglandin-Efflux nicht nur durch Indomethacin nahezu vollständig gehemmt wird, sondern auch im Falle einer funktionellen Inaktivierung der KS mittels Gadoliniumchlorid nahezu sistiert. Die Ergebnisse zeigen somit sowohl die Beteiligung von Kupffer Zellen als auch von Prostaglandinen bei der Stimulation der hepatischen GSH-Freisetzung.

Da in den hier untersuchten gesunden Rattenlebern überwiegend COX-I-Aktivität exprimiert wird (Crofford 1997), wurde in weiteren Experimenten der Einfluß des spezifischen COX-I-Inhibitors SC 560 untersucht. Auch in diesen Versuchen kam es zu einer vollständigen Hemmung der durch Zymosan stimulierten sinusoidalen GSH-Freisetzung.

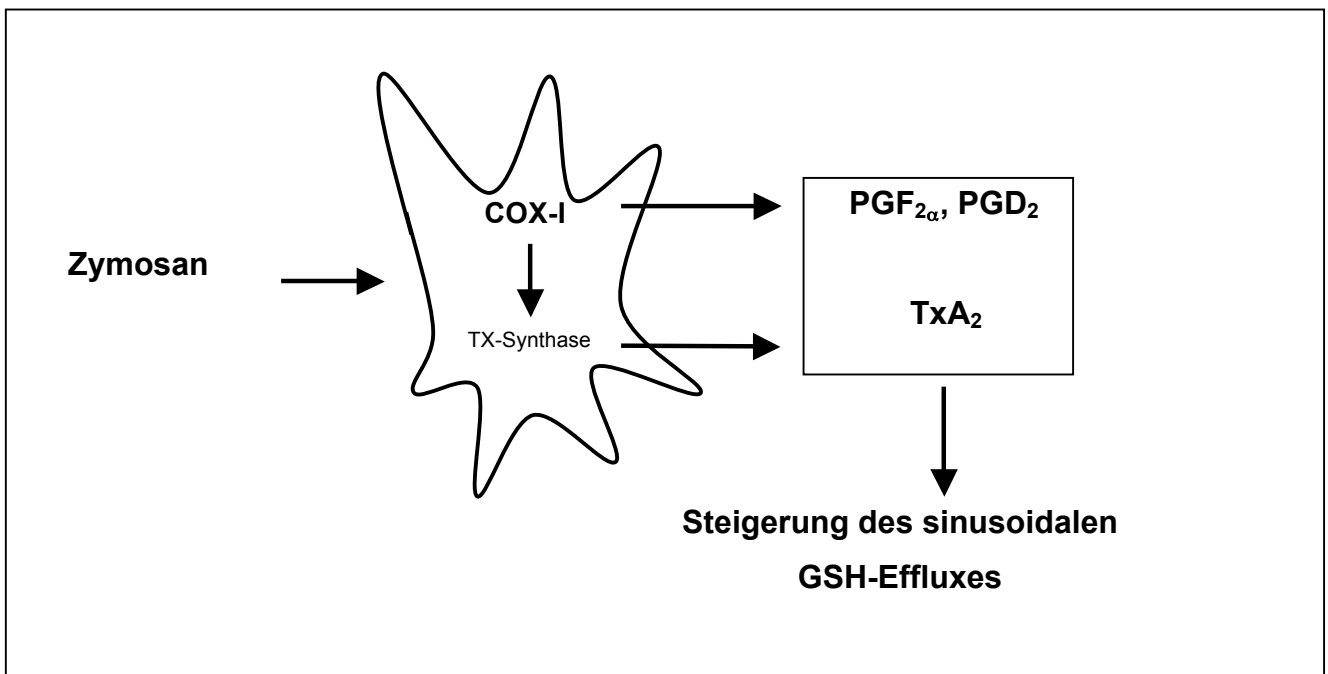


Abbildung 46: COX-I medierte Steigerung des sinusoidalen GSH-Effluxes nach KS-Aktivierung. Ausführliche Beschreibung im Text.

1.20.2 Funktionelle Bedeutung der Prostaglandine

Um die funktionelle Bedeutung der Prostaglandine bei der Regulation des hepatischen GSH-Exportes genauer zu charakterisieren, wurden in weiteren Experimenten zunächst der selektiven Thromboxan- Synthase- Inhibitor Furegrelate sowie der spezifische Thromboxan A₂-Rezeptorantagonist BM 13.177 untersucht (Häussinger 1988, Schieferdecker 1988). Sowohl durch Zugabe von Furegrelate als auch BM 13.177 kam es zu einer signifikanten ($p < 0.05$) Verminderung der durch Zymosan induzierten Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung. Beide Inhibitoren/Antagonisten führten darüber hinaus zu einer Reduktion des Zymosan-induzierten Zellschadens, was sich wiederum mit den Ergebnissen der Vergangenheit deckt, dass die Blockade von Thromboxan A₂ (Pestel 2003) das Ausmaß hepatischer Schäden im Rahmen von Streßreaktionen mit KS-Beteiligung senkt (Yokoyama 2005). Somit ließe sich schlussfolgern, dass bei der nach KS-Aktivierung beobachteten Steigerung der sinusoidalen GSH- Ausscheidung Thromboxan A₂ beteiligt ist

Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass die Aktivierung isolierter KS durch Zymosan zur gesteigerten Bildung und Freisetzung verschiedener Prostaglandine wie z.B. TxA₂, PGF_{2 α} , PGD₂, PGE₂ und Prostacyclin führt (Decker 1990, Kuiper 1988).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass eben diese Prostaglandine zusätzlich zu Thromboxan als Stimulatoren des sinusoidalen GSH- Exportes der Leber wirken. Nach Zugabe von PGF_{2 α} konnte eine signifikante Stimulation der GSH-Freisetzung beobachtet werden. Ähnliche Effekte zeigten sich nach Infusion von PGD₂, wohingegen PGE₂ keine Wirkung auf die Glutathion- Ausscheidung zeigte.

Überraschend war dagegen die Beobachtung, dass der TXA₂- Rezeptorantagonist U-46619 keinen signifikanten Einfluss auf die sinusoidalen GSH-Effluxraten hatte und die GSH- Ausscheidung in der U-46619- Gruppe tendenziell sogar abnahm.

Dies überrascht deshalb, weil die Stimulation der GSH- Ausscheidung durch Zymosan sowohl durch TxA_2 –Synthase Hemmung als auch durch TxA_2 – Rezeptorblockade aufgehoben wurde und auch metabolische Effekte von U-46619 auf die isoliert-perfundierte Leber in der hier verwendeten Konzentration gezeigt werden konnten (Häussinger 1988). Für diese Diskrepanz kaum verantwortlich erscheint eine Unterdosierung von U-46619. Durch die verwendete Konzentration kam es, im Vergleich zu der mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ behandelten Gruppe, neben dem nach PGD_2 - Infusion beobachteten Effekt auch zu einem wesentlich stärkeren Anstieg des Pfortaderdruckes und zu einem signifikanten Zellschaden.

Diese Ergebnisse zeigen zunächst, dass Zellschäden nicht zwangsläufig mit einer gesteigerten GSH- Freisetzung einhergehen bzw. eine Stimulation der hepatischen GSH- Freisetzung durch Prostaglandine ohne begleitenden Zellschaden möglich ist. Desweiteren sprechen diese Ergebnisse gegen eine durch TXA_2 - vermittelte direkte Stimulation des GSH- Transportes.

Hiermit vereinbar, konnte in isolierten Hepatozyten keine Expression des TXA_2 - Rezeptors nachgewiesen werden (Fennekohl 1999). Letzterer wird in der Leber vor allem in Sinusendothelzellen und Kupfferzellen exprimiert (Fennekohl 1999).

Im Gegensatz hierzu konnte jedoch, vereinbar mit der von uns beobachteten Stimulation der sinusoidalen GSH-Ausscheidung durch $\text{PGF}_{2\alpha}$, der für $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Effekte verantwortliche FP-Rezeptor in Hepatozyten nachgewiesen werden, was für eine „direkte“ Stimulation des hepatischen GSH-Transportes durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ spricht (Fennekohl 1999). Die hemmende Wirkung von TXA_2 -Synthese bzw. TXA_2 -Rezeptor-Blockade auf die sinusoidale GSH-Freisetzung kann bei fehlender TXA_2 -Rezeptor-Expression in Hepatozyten dagegen nur durch eine „indirekte“ Stimulation des GSH-Transportes durch TXA_2 erklärt werden.

Welche Signalwege hierbei durch TXA_2 nach KS-Aktivierung moduliert werden und den GSH-Transport stimulieren, ist Gegenstand zukünftiger experimenteller Untersuchungen.

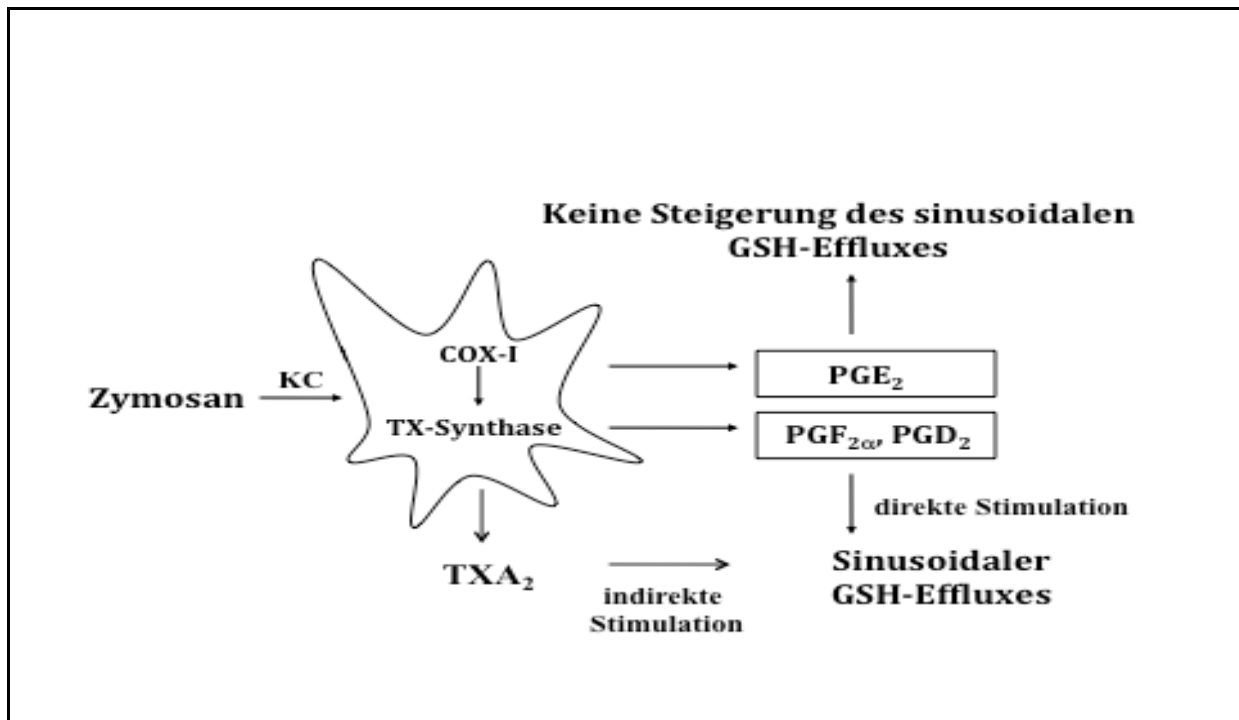


Abbildung 47: Postulierte Effekte der Prostaglandine auf den sinusoidalen GSH-Efflux nach KS- Aktivierung. Ausführliche Beschreibung im Text.

1.20.3 Beteiligung von Leukotrienen

Um zu klären, ob die Stimulation der sinusoidalen GSH- Ausscheidung ein alleiniger Prostaglandin-Effekt ist oder in einem Netzwerk zusammen mit anderen Entzündungsmediatoren vermittelt wird, wurde in weiteren Experimenten die Bedeutung von Cys-LT untersucht. Hierzu wurde die Leukotrienbiosynthese sowohl auf der Stufe der 5-Lipoxygenase (5-LPO) durch den spezifischen Inhibitor MK 886 inhibiert als auch Cys-LT₁-Rezeptor vermittelte Effekte von LTC₄ und LTD₄ durch den spezifischen Cys-LT₁-Antagonisten LY171883 blockiert.

Durch beide Ansätze konnte insbesondere die langanhaltende Stimulation der sinusoidalen GSH- Freisetzung nach KS-Aktivierung gehemmt werden. Vereinbar mit diesen Beobachtungen wurde die sinusoidale GSH- Ausscheidung während der Zugabe von LTC₄ zunächst nicht beeinflusst. Erst nach Beendigung der LTC₄ - Infusion kam es zu einem signifikanten ($p < 0.05$) und lang anhaltenden Anstieg der GSH-Freisetzung.

Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass die langanhaltende Stimulation der GSH- Freisetzung nach KS-Aktivierung durch Leukotriene vermittelt wird. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen kam es zur sofortigen Stimulation der GSH-Freisetzung während der Prostaglandin-Zufuhr.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse zwei wesentliche Komponenten der Regulation des hepatischen GSH-Transportes:

1. eine rasche aber nur transiente Stimulation durch Prostaglandine sowie
2. eine langanhaltende Stimualtion durch Cys-LT, die durch den Cys-LT₁ – Rezeptor vermittelt wird.

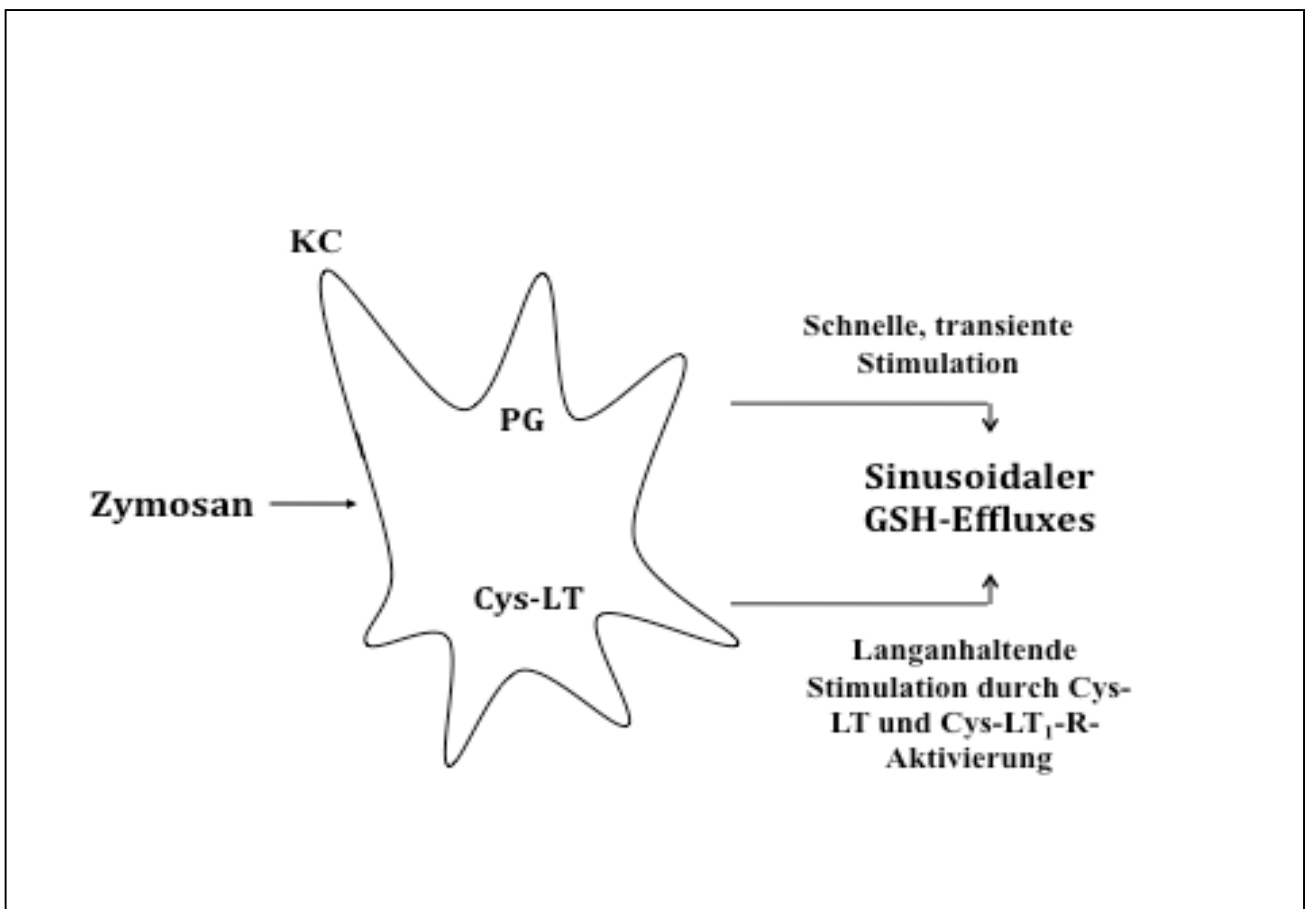


Abbildung 48: Regulation des hepatischen GSH-Transportes durch aktivierte KS : Beteiligte Mechanismen. Ausführliche Beschreibung im Text.

1.20.4 Gestörter GSH-Transport in Fettlebern

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Steigerung des sinusoidalen GSH- Exportes der Leber nach KS -Aktivierung durch Entzündungsmediatoren aus der Familie der Eicosanoide. Im Falle systemischer Infektionen könnte dieser bislang nicht bekannte Mechanismus einen wesentlichen Beitrag zur GSH-Versorgung entzündeter Gewebe leisten, wodurch die in diesen entzündeten Geweben vermehrt gebildeten Sauerstoffradikale durch das Antioxidans GSH entgiftet werden könnten. Dieses fragile Zusammenspiel wäre wiederum durch Erkrankungen der Leber gegebenenfalls empfindlich zu stören. Ein bereits weit verbreitetes und in Zukunft wohl noch zunehmendes Problem des Gesundheitswesens ist die mit Adipositas und dem metabolischen Syndrom einhergehende Fettleber (Day 1998). Zahlreiche Arbeiten weisen zudem auf eine in Fettlebern gestörte Zytokin-Produktion durch KS hin (Anderson 2008).

Es stellt sich daher die Frage, ob in steatotischen Lebern die Regulation des hepatischen GSH-Effluxes gestört ist. Dies könnte den besonders dramatischen Verlauf systemischer Infektionen bei Patienten mit Fettleberhepatitis zumindest teilweise erklären.

Eine erste überraschende Beobachtung unserer Versuche war, dass der hepatische Grundgehalt an GSH in normalen und steatotischen Lebern homozygoter Zuckerratten nahezu identisch ist. Dennoch wurden bei Fettlebern signifikant geringere GSH-Effluxraten gemessen, was bei gleichem intrazellulären GSH-Gehalt für einen gestörten GSH-Export spricht. Zusätzlich zeigte sich nach Aktivierung der KS durch Zymosan in den steatotischen Lebern ein wesentlich geringerer Anstieg der sinusoidalen GSH- Ausscheidung. Während die GSH-Ausscheidung der normalen Lebern um 15 nmol/min x g Leber zunahm, betrug die Mehrausscheidung der verfetteten Lebern maximal 2.5 nmol/min x g Leber.

Nachdem die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen, dass in gesunden Lebern Prostaglandine und Leukotriene die Erhöhung der sinusoidalen GSH-Effluxraten medieren, wurde in einem ersten Ansatz untersucht, ob eine Verminderung der Prostaglandin-Synthese ursächlich an der beobachteten Verminderung des sinusoidalen GSH-Effluxes beteiligt ist.

Hierzu wurde TXB₂ und PGF_{2 α} im effluenten Perfusat der steatotischen Lebern bestimmt. Die Auswertung dieser Messungen ergab für beide Prostaglandine eine massive ($p < 0.05$) Stimulation ihrer sinusoidalen Effluxraten nach Aktivierung der KS. Im Vergleich zur Gruppe der Sprague-Dawley Ratten waren die Prostaglandin-Effluxraten der steatotischen Lebern homozygoter Zucker-Ratten jedoch um ca. 60 % vermindert ($p < 0.05$).

Der immunhistochemische Nachweis von Kupffer-Zellen mittels ED₂-Antikörper-Staging ergab in Fettlebern eine um 25% verminderte Dichte der Kupffer-Zellen (Promotionsarbeit T. Prüfer 2008), die die beobachtete Abnahme der Prostaglandin-Synthese jedoch nur teilweise erklärt. Unsere Ergebnisse zeigen eine in steatotischen Lebern homozygoter Zucker-Ratten verminderte Prostaglandin-Synthese nach KS-Aktivierung. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten in diesen Fettlebern ferner eine um ca. 70% verminderte Proteinexpression des GSH-Transporters Oatp2 nachweisen (Geier 2005).

Zusammenfassend können Erkrankungen der Leber, wie hier am Beispiel der Leberverfettung gezeigt, zu beträchtlichen Störungen des sinusoidalen GSH-Exportes führen, wodurch es insbesondere während Streßsituationen zu einer Unterversorgung extrahepatischer Gewebe mit GSH kommen könnte.

Die pathophysiologische Relevanz dieser Befunde bleibt jedoch zunächst noch unklar und sollte im nächsten Schritt an Patienten mit Lebererkrankungen untersucht werden. Grundsätzlich könnte die hier nachgewiesene Störung des GSH-Transportes in Fettlebern zur besonderen Schwere von Infektionen bei Patienten mit Leber-Erkrankungen beitragen.

Zusammenfassung

Im Zuge jeder Entzündungsreaktion des Körpers werden Granulozyten und Gewebsmakrophagen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, den sog. ROS angeregt, die je nach Lebensdauer des Radikals, Bildungsort und Reaktionspartner zu strukturellen und funktionellen Störungen bis hin zum Zelltod führen können.

Das Ausmaß dieser oxidativen Schäden ist von der Expression verschiedener antioxidativer Schutzmechanismen abhängig.

Eine zentrale Rolle spielt hierbei das Antioxidans Glutathion, das von der Leber über aktive Transportsysteme in den Blutstrom abgegeben wird. Hierbei handelt es sich um einen endogenen Schutzmechanismus, der einerseits Leberzellen vor den von Kupffer Zellen gebildeten ROS schützt und andererseits alle extrahepatischen Gewebe mit GSH versorgt.

Es ist bekannt, dass der hepatische GSH-Export sowie die Plasmakonzentrationen von GSH bei Sepsis stark ansteigen, während der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht untersucht wurde.

Kupffer'sche Sternzellen (KS), die residenten Makrophagen der Leber, kommen nicht nur als größte, sondern auch als eine der ersten Makrophagenpopulationen des Körpers im Rahmen einer Infektion mit pathogenen Keimen in Kontakt. Durch bakterielle Bestandteile wie Endotoxine oder die in der Zellwand von Bakterien und Pilzen verankerten β - Glucane, werden KS aktiviert und haben entscheidenden Anteil an der Bildung und Freisetzung vasoaktiver Substanzen, freier Sauerstoffradikale (ROS) sowie anderer pro-inflammatorischer Mediatoren wie Zytokinen (TNF- α , IL-1, IL-6) und Eicosanoiden.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte deshalb untersucht werden, ob der hepatische Glutathion-Transport durch Kupffer-Zellen reguliert wird und wenn ja, welche Mediatoren an dieser Regulation beteiligt sind.

Die Experimente wurden am **Modell der isoliert perfundierten Rattenleber** mit einem zellfreien Krebs-Henseleit-Puffer durchgeführt.

Dieses Modell erlaubt die selektive Aktivierung von Kupffer-Zellen ohne störende Einflüsse durch extrahepatische Makrophagen oder Granulozyten. Die Kupffer-Zellen wurden durch eine 6- minütige Infusion von Zymosan (150 μ g/ml), einem β -Glucan reichen Zellwandpartikel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, aktiviert.

Als wesentliche Ergebnisse bleiben festzuhalten:

- **Gesteigerte Glutathionfreisetzung durch aktivierte KS:** Die Aktivierung der Kupffer'schen Sternzellen durch Zymosan führt zu einem transienten, wenige Minuten anhaltenden Anstieg der sinusoidalen GSH-Freisetzung um mehr als 100 %. Diesem schliesst sich eine lang anhaltende Erhöhung der GSH-Effluxraten um ca. 40 % an.
Eine funktionelle Inaktivierung der Kupffer-Zellen mittels Gadoliniumchlorid (GdCl₃) konnte diesen Effekt nahezu vollständig hemmen.
Diese Ergebnisse zeigen somit erstmals eine Stimulation des sinusoidalen GSH-Exports durch aktivierte KS.
- **Bedeutung von Cyclooxygenase I und Cyclooxygenase II:**
Die nach KS- Aktivierung beobachtete Erhöhung des sinusoidalen GSH-Effluxes geht mit einer massiv erhöhten Bildung der Prostaglandine TXA₂, PGF_{2 α} und PGD₂ einher. Durch die Behandlung der Lebern sowohl mit dem COX-I/COX II- Inhibitor Indomethacin als auch mit dem selektiven COX-I- Inhibitor SC 560 wurde der maximale, initiale GSH-Efflux signifikant reduziert, während der COX II-Inhibitor DUP 697 keine Effekte zeigte. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Steigerung des GSH-Effluxes nach KS-Aktivierung Cyclooxygenase-I-vermittelt ist.

- **Funktionelle Bedeutung der Prostaglandine:** Sowohl durch die Zugabe des Thromboxan-Synthase-Inhibitors Furegrelate als auch des Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten BM 13.177 wurde die durch Zymosan induzierte Stimulation des sinusoidalen GSH-Effluxes signifikant vermindert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die nach KS-Aktivierung beobachtete Steigerung der sinusoidalen GSH-Ausscheidung durch Thromboxan A₂ mediiert wird. Überraschenderweise führte die direkte Zufuhr des TxA₂-Agonisten U-46619 jedoch im Gegensatz zur Zufuhr von PGF_{2α} und PGD₂ zu keiner Stimulation der sinusoidalen GSH-Freisetzung.

Diese Ergebnisse zeigen somit sowohl eine indirekte Beteiligung von TxA₂ als auch eine direkte Beteiligung von PGF_{2α} und PGD₂ bei der Stimulation der hepatischen GSH-Ausscheidung nach KS-Aktivierung. Mit dieser Beobachtung vereinbar, exprimieren Hepatozyten insbesondere den durch PGF_{2α} stimulierten FP-Rezeptor, nicht aber den durch TxA₂ stimulierten TP-Rezeptor.

- **Bedeutung der Cys-Leukotriene:** Die Hemmung der Leukotrienbiosynthese auf der Stufe der 5-Lipoxygenase (5-LPO) durch den spezifischen Inhibitor MK 886 führte ähnlich wie die Blockierung des Cys-LT₁-Rezeptors durch den Antagonisten LY171883 zu einer signifikanten Hemmung des initialen und langanhaltenden Anstiegs der GSH-Freisetzung. Zudem verminderte der 5-LPO-Inhibitor im Gegensatz zum Rezeptorantagonisten auch den entstandenen Zellschaden. Bei direkter Zufuhr von LTC₄ über die Pfortaderkanüle kam es zu einem signifikanten und lang anhaltenden Anstieg der GSH-Freisetzung.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die langanhaltende Stimulation der GSH-Freisetzung durch KS-Aktivierung am ehesten durch Cys-Leukotriene vermittelt wird.

- **Charakterisierung der beschriebenen Mechanismen in Zucker-Ratten:**
Unsere Untersuchungen zeigten, dass in steatotischen Lebern homozygoter Zucker-Ratten der Grundgehalt an hepatischem GSH nahezu identisch mit dem in gesunden Lebern ist. Nach Perfusion der Fettlebern mit Krebs-Henseleit-Puffer fielen jedoch im Vergleich zu normalen Lebern männlicher Sprague-Dawley-Ratten signifikant niedrigere basale GSH-Effluxraten auf, während nach Aktivierung der KS durch Zymosan nur ein minimaler Anstieg der sinusoidalen GSH-Ausscheidung auftrat. Die Zellschädigung war dabei in beiden Gruppen nahezu identisch. Die Bestimmung von TxB_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ ergab nach KS-Aktivierung eine Verminderung der Effluxraten im Vergleich zu gesunden Lebern um ca. 60 %.

Diese Ergebnisse zeigen somit eine in Fettlebern verminderte Stimulation des sinusoidalen GSH-Exportes nach KS-Aktivierung, wofür unter anderem eine gestörte Prostaglandinbildung verantwortlich sein könnte.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen einen neuen endogenen antioxidativen Schutzmechanismus: Die Stimulation des sinusoidalen GSH-Transportes durch aktivierte Kupffer Zellen unter Beteiligung von Prostaglandinen und Cys-LT. Dieser Schutzmechanismus ist in Fettlebern gestört und könnte auf eine Unterversorgung extrahepatischer Gewebe mit GSH hinweisen.

Literaturverzeichnis

- Akerboom TP, Bilzer M, Sies H. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J Biol Chem* 1982;257:4248-4252.
- Akerboom TP, Bilzer M, Sies H. Competition between transport of glutathione disulfide (GSSG) and glutathione S-conjugates from perfused rat liver into bile. *FEBS Lett* 1982;140:73-76.
- Akerboom T IM, Sies H, Kinne R, Arias I M. . Biliary transport of glutathione disulfide studied with isolated rat-liver canalicular-membrane vesicles. *European Journal of Biochemistry* 1984;141:211-215.
- Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol.* 2001;78:1-56. Review
- Anderson N, Borlak J Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis *Pharmacol Rev.* 2008 Sep;60(3):311-57. Review
- Anundi I, Högberg J, Stead AH. Glutathione depletion in isolated hepatocytes: its relation to lipid peroxidation and cell damage. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1979 Jul;45(1):45-51
- Aw TY, Ookhtens M, Ren C, Kaplowitz N. Kinetics of glutathione efflux from isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1986;250:G236-243.
- Aw TY, Ookhtens M, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. Trans-stimulation and driving forces for GSH transport in sinusoidal membrane vesicles from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;143:377-382.
- Baker RR. The eicosanoids: a historical overview. *Clin Biochem* 1990;23:455-458.
- Ballatori N, Dutczak WJ. Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem* 1994;269:19731-19737.
- Ballatori N, Truong AT. Multiple canalicular transport mechanisms for glutathione S-conjugates. Transport on both ATP- and voltage-dependent carriers. *J Biol Chem* 1995;270:3594-3601.
- Ballatori N, Rebbeor JF. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis* 1998;18:377-387.
- Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:238-255.

- Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med* 2008.
- Bezugla Y KA, Kamionka S , Bernard B , Scheibe R, Dieter P. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006;79:93-100.
- Bilzer M Peptidoleukotrienes increase the efflux of glutathione from perfused rat liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1993;49:715-721.
- Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1999;276:G1137-1144.
- Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 1999;117:200-210.
- Bilzer M, Baron A, Schauer R, Steib C, Ebensberger S, Gerbes AL. Glutathione treatment protects the rat liver against injury after warm ischemia and Kupffer cell activation. *Digestion* 2002;66:49-57.
- Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006;26:1175-1186.
- Birmelin M, Decker K. Synthesis of prostanoids and cyclic nucleotides by phagocytosing rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 1984;142:219-225.
- Bowers GJ MT, Hirsch EF, Conklin JC, Nelson RD, Roethel RJ, Fink MP. Prostanoid production by lipopolysaccharide-stimulated Kupffer cells. *J Surg Res* 1985;38:501-508.
- Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994;267:G630-636.
- Brouwer A, Barelds RJ, Knook DL. Age-related changes in the endocytic capacity of rat liver Kupffer and endothelial cells. *Hepatology* 1985;5:362-366.
- Brouwer A, Barelds RJ, de Leeuw AM, Blauw E, Plas A, Yap SH, van den Broek AM, et al. Isolation and culture of Kupffer cells from human liver. Ultrastructure, endocytosis and prostaglandin synthesis. *J Hepatol* 1988;6:36-49.
- Brown M, Bing C, King P, Pickavance L, Heal D, Wilding J. Sibutramine reduces feeding, body fat and improves insulin resistance in dietary-obese male Wistar rats independently of hypothalamic neuropeptide Y. *Br J Pharmacol*. 2001 Apr;132(8):1898-904.

- Buxton DB, Fisher RA, Robertson SM, Olson MS. Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction by adenosine and adenosine analogues in the perfused rat liver. *Biochem J* 1987;248:35-41.
- Bykov I, Ylipaasto P, Eerola L, Lindros KO. Phagocytosis and LPS-stimulated production of cytokines and prostaglandin E2 is different in Kupffer cells isolated from the periportal or perivenous liver region. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1256-1261.
- Bykov I, Ylipaasto P, Eerola L, Lindros KO. Functional differences between periportal and perivenous Kupffer cells Isolated by Digitonin-Collagenase Perfusion. *Comp Hepatol* 2004;3 Suppl 1:S34.
- Callery MP, Mangino MJ, Kamei T, Flye MW. Interleukin-6 production by endotoxin-stimulated Kupffer cells is regulated by prostaglandin E2. *J Surg Res* 1990;48:523-527.
- Callery MP, Mangino MJ, Flye MW. Kupffer cell prostaglandin-E2 production is amplified during hepatic regeneration. *Hepatology* 1991;14:368-372.
- Chandrashekhar R. Gandhi KS, Merle S. Olson. A comparative study of endothelin- and platelet-activating- factor-mediated signal transduction and prostaglandin synthesis in rat Kupffer cells *Biochem. J.* 1992;281:485-492.
- Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl.* 1997 Jul;49:15-9. Review.
- Day CP, James OF,. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998; 27: 1463-1466.
- de Leeuw AM, Brouwer A, Barelds RJ, Knook DL. Maintenance cultures of Kupffer cells isolated from rats of various ages: ultrastructure, enzyme cytochemistry, and endocytosis. *Hepatology* 1983;3:497-506.
- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245-261.
- DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991;52:287-305.
- Dieter P, Altin JG, Decker K, Bygrave FL. Possible involvement of eicosanoids in the zymosan and arachidonic-acid-induced oxygen uptake, glycogenolysis and Ca²⁺ mobilization in the perfused rat liver. *Eur J Biochem* 1987;165:455-460.
- Dieter P, Schulze-Specking A, Decker K. Ca²⁺ requirement of prostanoid but not of superoxide production by rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 1988;177:61-67.
- Dieter P, Peters T, Schulze-Specking A, Decker K. Independent regulation of thromboxane and prostaglandin synthesis in liver macrophages. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1577-1581.

Dieter P, Hempel U, Kamionka S, Kolada A, Malessa B, Fitzke E, Tran-Thi TA. Prostaglandin E2 affects differently the release of inflammatory mediators from resident macrophages by LPS and muramyl tripeptides. *Mediators Inflamm* 1999;8:295-303.

Dieter P, Hempel U, Malessa B, Fitzke E, Tran-Thi TA, MacLouf J, Creminon C. Lipopolysaccharide- and liposome-encapsulated MTP-PE-induced formation of eicosanoids, nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Adv Exp Med Biol* 1999;469:443-448.

Ding H, Huang JA, Tong J, Yu X, Yu JP. Influence of Kupffer cells on hepatic signal transduction as demonstrated by second messengers and nuclear transcription factors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2519-2522.

Dutczak WJ, Ballatori N. Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. *J Biol Chem* 1994;269:9746-9751.

Ember JA, Hugli TE. Complement factors and their receptors. *Immunopharmacology*. 1997 Dec;38(1-2):3-15. Review.

Fabriez BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*. 2005;210(2-4):153-60. Review

Fennekohl A, Schieferdecker HL, Jungermann K, Peschel GP. Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. *J Hepatol* 1999;30:38-47.

Fennekohl A, Lucas M, Puschel GP. Induction by interleukin 6 of G(s)-coupled prostaglandin E(2) receptors in rat hepatocytes mediating a prostaglandin E(2)-dependent inhibition of the hepatocyte's acute phase response. *Hepatology* 2000;31:1128-1134.

Fernandez-Checa JC, Ren C, Aw TY, Ookhtens M, Kaplowitz N. Effect of membrane potential and cellular ATP on glutathione efflux from isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1988;255:G403-408.

Fernandez-Checa JC, Maddatu T, Ookhtens M, Kaplowitz N. Inhibition of GSH efflux from rat liver by methionine: effects of GSH synthesis in cells and perfused organ. *Am J Physiol* 1990;258:G967-973.

Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C, Colell A, Yi JR, Kaplowitz N. Inhibition of rat sinusoidal GSH transporter by thioethers: specificity, sidedness, and kinetics. *Am J Physiol* 1996;270:G969-975.

Fernandez-Checa JC, Yi JR, Garcia Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N. Plasma membrane and mitochondrial transport of hepatic reduced glutathione. *Semin Liver Dis* 1996;16:147-158.

Fernandez-Checa JC KN. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:263-273.

Ferrante AW, Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007;262:408-414.

Fisher RA, Robertson SM, Olson MS. Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction in the perfused rat liver by the thromboxane A2 analogue U-46619. *J Biol Chem* 1987;262:4631-4638.

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol.* 1996 Apr;148(4):1237-47.

Fraser R, Bowler LM, Day WA. Damage of rat liver sinusoidal endothelium by ethanol. *Pathology.* 1980 Jul;12(3):371-6.

Geier Andreas GC, Matern Siegfried. Regulationsmechanismen hepatobiliärer Transporter bei cholestatischen Erkrankungen. *Medizinische Klinik* 2004;99:7-17.

Geier A, Dietrich CG, Grote T, Beuers U, Prufer T, Fraunberger P, Matern S, et al. Characterization of organic anion transporter regulation, glutathione metabolism and bile formation in the obese Zucker rat. *J Hepatol* 2005;43:1021-1030.

Gerbes AL, Bilzer M, Gülberg V. Intrahepatic modulation of portal pressure and its role in portal hypertension. Role of endothelins. *Digestion.* 1998 Jul-Aug;59(4):410-2. Review.

Goss JA, Mangino MJ, Callery MP, Flye MW. Prostaglandin E2 downregulates Kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. *Am J Physiol* 1993;264:G601-608.

Gregory SH, Wing EJ. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol.* 2002 Aug;72(2):239-48.

Gregory SH, Cousens LP, van Rooijen N, Döpp EA, Carlos TM, Wing EJ. Complementary adhesion molecules promote neutrophil-Kupffer cell interaction and the elimination of bacteria taken up by the liver. *J Immunol.* 2002 Jan 1;168(1):308-15.

Hafenrichter DG, Roland CR, Mangino MJ, Flye MW. The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. *Shock* 1994;2:251-256.

Hahn R, Wendel A, Flohe L. The fate of extracellular glutathione in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1978;539:324-337.

Hammond CL, Lee TK, Ballatori N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* 2001;34:946-954.

Hammond CL, Madejczyk MS, Ballatori N. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:12-22.

Hammond Christine L MMS, Ballator Nazzareno. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:12-22.

Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 1992;52:296-302.

Haussinger D, Stehle T, Tran-Thi TA, Decker K, Gerok W. Prostaglandin responses in isolated perfused rat liver: Ca²⁺ and K⁺ fluxes, hemodynamic and metabolic effects. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1987;368:1509-1513.

Haussinger D, Busshardt E, Stehle T, Stoll B, Wettstein M, Gerok W. Stimulation of thromboxane release by extracellular UTP and ATP from perfused rat liver. Role of eicosanoids in mediating the nucleotide responses. *Eur J Biochem* 1988;178:249-256.

Haussinger D, Stehle T. Hepatocyte heterogeneity in response to eicosanoids. The perivenous scavenger cell hypothesis. *Eur J Biochem* 1988;175:395-403.

Haussinger D, Stehle T, Gerok W. Effects of leukotrienes and the thromboxane A₂ analogue U-46619 in isolated perfused rat liver. Metabolic, hemodynamic and ion-flux responses. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988;369:97-107.

Hinchman CA, Truong AT, Ballatori N. Hepatic uptake of intact glutathione S-conjugate, inhibition by organic anions, and sinusoidal catabolism. *Am J Physiol* 1993;265:G547-554.

Hong Ding J-AH, Jing Tong, Xin Yu, Jie-Ping Yu. Influence of Kupffer cells on hepatic signal transduction as demonstrated by second messengers and nuclear transcription factors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2519-2522.

Iimuro Y, Yamamoto M, Kohno H, Itakura J, Fujii H, Matsumoto Y. Blockade of liver macrophages by gadolinium chloride reduces lethality in endotoxemic rats--analysis of mechanisms of lethality in endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994;55:723-728.

Ishiguro S, Arai S, Monden K, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H, Fujita S, et al. Identification of the thromboxane A₂ receptor in hepatic sinusoidal endothelial cells and its role in endotoxin-induced liver injury in rats. *Hepatology* 1994;20:1281-1286.

Jaeschke H. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *Am J Physiol* 1990;258:G499-505.

Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260:G355-362.

Jaeschke H. Enhanced sinusoidal glutathione efflux during endotoxin-induced oxidant stress in vivo. *Am J Physiol* 1992;263:G60-68.

Jaeschke H. The therapeutic potential of glutathione in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1993;56:256-257.

Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993;264:G801-809.

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Contribution of complement-stimulated hepatic macrophages and neutrophils to endotoxin-induced liver injury in rats. *Hepatology* 1994;19:973-979.

Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;139:213-226.

Jaeschke H. Chemokines, neutrophils, and inflammatory liver injury. *Shock* 1996;6:403-404.

Jaeschke H. Chemokines and liver inflammation: the battle between pro- and anti-inflammatory mediators. *Hepatology* 1997;25:252-253.

Jaeschke H. Kupffer cell-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: does the controversy continue? *Hepatology* 1999;30:1527-1528.

Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999;29:443-450.

Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 2002;33:210-219.

Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* 2003;16:127-140.

Jaeschke H. Involvement of Kupffer cells in the interaction between neutrophils and sinusoidal endothelial cells in rats. *Shock* 18(2):152-157, 2002. *Shock* 2003;19:394-395; author reply 395-396.

Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-26.

Jaeschke H, Bajt ML. Regulation of apoptotic signaling pathways in hepatocytes in vivo. *Hepatology* 2003;37:942-945.

Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1083-1088.

Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 2006;26:912-919.

- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 1994;54:4833-4836.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 1996;56:988-994.
- Jones DE. Fat is an immuno-regulatory issue. *Hepatology* 2005;42:755-758.
- Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985;25:715-744.
- Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC, Kannan R, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M, Yi JR. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996;377:267-273.
- Karaa A, Kamoun W, Xu H, Zhang J, Clemens M. Differential Effects of Oxidative Stress on Hepatic Endothelial and Kupffer Cell Eicosanoid Release in Response to Endothelin-1. *Microcirculation* 2006;13:457-466.
- Keppler D, Jedlitschky G, Leier I. Transport and metabolism of leukotrienes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1994;22:83-89.
- Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, Mayer R, Buchler M. The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. *Adv Enzyme Regul* 1996;36:17-29.
- Keppler D, Konig J, Buchler M. The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul* 1997;37:321-333.
- Keppler D, Leier I, Jedlitschky G. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol Chem* 1997;378:787-791.
- Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, Konig J. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:153-161.
- Keppler D, Jedlitschky G, Leier I. Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein. *Methods Enzymol* 1998;292:607-616.
- Keppler D, Cui Y, Konig J, Leier I, Nies A. Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:237-246.
- Kiemer AK, Baron A, Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide as a regulator of Kupffer cell functions. *Shock* 2002;17:365-371.

Kolios G, Valatas V, Manousou P, Xidakis C, Notas G, Kouroumalis E. Nitric oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2008;319:91-98.

König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999;1461:377-394.

Koneru B, Reddy MC, dela Torre AN, Patel D, Ippolito T, Ferrante RJ. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation*. 1995 Apr 15;59(7):942-6.

Kuiper J, Zijlstra FJ, Kamps JA, van Berkel TJ. Identification of prostaglandin D2 as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells. *Biochim Biophys Acta* 1988;959:143-152.

Laskin DL. Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin Liver Dis*. 1990 Nov;10(4):293-304. Review.

Lauterburg BH, Smith CV. Stimulation of hepatic efflux and turnover of glutathione by methionine in the rat. *Eur J Clin Invest* 1986;16:494-499.

Lee TK, Li L, Ballatori N. Hepatic glutathione and glutathione S-conjugate transport mechanisms. *Yale J Biol Med* 1997;70:287-300.

Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* 1996;314 (Pt 2):433-437.

Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N. Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* 1998;273:16184-16191.

Li L, Meier PJ, Ballatori N. Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* 2000;58:335-340.

Li Z, Lin H, Yang S, Diehl AM. Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* 2002;123:1304-1310.

Liu P, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin-induced liver injury during ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1994;43:64-70.

Liu P, McGuire GM, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia. *Shock* 1995;3:56-62.

Lou H, Kaplowitz N. Glutathione depletion down-regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activity via I kappaB kinase-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2007;282:29470-29481.

Lu SC, Garcia-Ruiz C, Kuhlenkamp J, Ookhtens M, Salas-Prato M, Kaplowitz N. Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem* 1990;265:16088-1609.

Lu SC, Kuhlenkamp J, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N. Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin Invest* 1991;88:260-269.

Lu SC GJ, Huang HY, Kuhlenkamp J, Kaplowitz N. Thiol-disulfide effects on hepatic glutathione transport. Studies in cultured rat hepatocytes and perfused livers. *J Clin Investigation* 1993;92:1188-1197.

Ma X, Hua J, Mohamood AR, Hamad AR, Ravi R, Li Z. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology* 2007;46:1519-1529.

Marchan R, Hammond CL, Ballatori N. Multidrug resistance-associated protein 1 as a major mediator of basal and apoptotic glutathione release. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:2413-2420.

Matsumoto M, Seya T, Nagasawa S. Polymorphism and proteolytic fragments of granulocyte membrane cofactor protein (MCP, CD46) of complement. *Biochem. J.* 1992;281:493-499.

McCuskey RS, Urbaschek R, McCuskey PA, Urbaschek B. In vivo microscopic observations of the responses of Kupffer cells and the hepatic microcirculation to *Mycobacterium bovis* BCG alone and in combination with endotoxin. *Infect Immun.* 1983 Oct;42(1):362-7.

McCuskey RS, Urbaschek R, McCuskey PA, Urbaschek B. In vivo microscopic studies of the responses of the liver to endotoxin. *Klin Wochenschr.* 1982 Jul 15;60(14):749-51.

Meister A. New aspects of glutathione biochemistry and transport--selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr Rev* 1984;42:397-410.

Meister A. New developments in glutathione metabolism and their potential application in therapy. *Hepatology* 1984;4:739-742.

Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:16-28.

Ogle CK, Wu JZ, Alexander JW, Fischer JE, Ogle JD. The effects of in vivo administration of endotoxin on the functions and interaction of hepatocytes and Kupffer cells. *Prostaglandins* 1991;41:169-183.

Ogle CK, Wu JZ, Mao X, Szczur K, Alexander JW, Ogle JD. Heterogeneity of Kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. *Inflammation* 1994;18:511-523.

Okamoto T, Hino O. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA in rat tissues: tissue-specific difference in the expression of the basal level of mRNA. *Int J Mol Med.* 2000 Oct;6(4):455-7.

Ookhtens M, Hobdy K, Corvasce MC, Aw TY, Kaplowitz N. Sinusoidal efflux of glutathione in the perfused rat liver. Evidence for a carrier-mediated process. *J Clin Invest* 1985;75:258-265.

Ookhtens M, Lyon I, Fernandez-Checa J, Kaplowitz N. Inhibition of glutathione efflux in the perfused rat liver and isolated hepatocytes by organic anions and bilirubin. Kinetics, sidedness, and molecular forms. *J Clin Invest* 1988;82:608-616.

Oosten van M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J. Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology*. 1995 Nov;22(5):1538-46.

Orrenius S, Ormstad K, Thor H, Jewell SA. Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells. *Fed Proc* 1983;42:3177-3188.

Ouwendijk RJ, Zijlstra FJ, van den Broek AM, Brouwer A, Wilson JH, Vincent JE. Comparison of the production of eicosanoids by human and rat peritoneal macrophages and rat Kupffer cells. *Prostaglandins* 1988;35:437-446.

Pestel Sabine JK, Götze Otto, Schieferdecker Henrike L. Inhibition by Prostaglandin E2 of Anaphylatoxin C5a- but Not Zymosan-Induced Prostanoid Release from Rat Kupffer Cells. *Laboratory Investigation* 2002;82:463-471.

Pestel Sabine NA, Jungermann Kurt, Schieferdecker Henrike L. Inhibition of prostaglandin D2 clearance in rat hepatocytes by the thromboxane receptor antagonists daltraban and ifetroban and the thromboxane synthase inhibitor furegrelate *Biochemical Pharmacology* 2003;66:643-652.

Pestel Sabine SG, Götze Otto, Jungermann Kurt, Schieferdecker Henrike L. Differences in the Involvement of Prostanoids from Kupffer Cells in the Mediation of Anaphylatoxin C5a-, Zymosan-, and Lipopolysaccharide-Dependent Hepatic Glucose Output and Flow Reduction. *Lab Invest* 2003;83:1733-1741.

Peters T, Karck U, Decker K. Interdependence of tumor necrosis factor, prostaglandin E2, and protein synthesis in lipopolysaccharide-exposed rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 1990;191:583-589.

Puschel GP, Hespeling U, Oppermann M, Dieter P. Increase in prostanoid formation in rat liver macrophages (Kupffer cells) by human anaphylatoxin C3a. *Hepatology* 1993;18:1516-1521.

Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* 2007;35:757-766.

Rebbeor JF, Connolly GC, Dumont ME, Ballatori N. ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *J Biol Chem* 1998;273:33449-33454.

Rebbeor JF, Connolly GC, Henson JH, Boyer JL, Ballatori N. ATP-dependent GSH and glutathione S-conjugate transport in skate liver: role of an Mrp functional homologue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G417-425.

Rebbeor JF, Connolly GC, Ballatori N. Inhibition of Mrp2- and Ycf1p-mediated transport by reducing agents: evidence for GSH transport on rat Mrp2. *Biochim Biophys Acta* 2002;1559:171-178.

Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology*. 2003 Aug;38(2):374-84.

Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Apr;290(4):G640-9.

Roland Claude R GJA, Mangino M J, Hafenrichter D, Flye M W. Autoregulation by Eicosanoids of Human Kupffer Cell Secretory Products *Annals of Surgery* 1994;219:389-399.

Roland CR, Naziruddin B, Mohanakumar T, Flye MW. Gadolinium chloride inhibits Kupffer cell nitric oxide synthase (iNOS) induction. *J Leukoc Biol* 1996;60:487-492.

Roland CR NB, Mohanakumar T, Flye M. Wayne. Gadolinium blocks rat kupffer cell calcium channels: Relevance to calcium-dependent prostaglandin synthesis and septic mortality. *Hepatology* 1999;29:756-765.

Ryter SW, Choi AM. Cytoprotective and anti-inflammatory actions of carbon monoxide in organ injury and sepsis models. *Novartis Found Symp*. 2007;280:165-75; discussion 175-81. Review.

Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* 2004;239:220-231.

Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Schildberg FW, Messmer K. Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2004;10:864-870.

Schieferdecker HL, Pestel S, Puschel GP, Gotze O, Jungermann K. Increase by anaphylatoxin C5a of glucose output in perfused rat liver via prostanoids derived from nonparenchymal cells: direct action of prostaglandins and indirect action of thromboxane A(2) on hepatocytes. *Hepatology* 1999;30:454-461.

Shimazu T, Kondo S, Toyama K, Komurai M, Ohminato M, Yasuda T, Sato T, Maeba T, Maruyama H, Owada S, Ishida M. Effect of vitamin E-modified regenerative cellulose membrane on neutrophil superoxide anion radical production and lipid peroxidation. *Contrib Nephrol*. 1999;127:251-60.

Sies H GP. Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenalin. *Biochem. J.* 1985;226:545-549.

Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 1991;49:153-179.

Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology.* 2001 Jul;34(1):13-8.

Suematsu M, Ishimura Y. The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology.* 2000 Jan;31(1):3-6.

Takikawa H, Fernandez-Checa JC, Kuhlenkamp J, Stolz A, Ookhtens M, Kaplowitz N. Effect of indomethacin on the uptake, metabolism and excretion of 3-oxocholeic acid: studies in isolated hepatocytes and perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1991;1084:247-250.

Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation.* 1993 Apr;55(4):737-41.

Tran-Thi TA, Gyufko K, Henninger H, Busse R, Decker K. Studies on synthesis and degradation of eicosanoids by rat hepatocytes in primary culture. *J Hepatol* 1987;5:322-331.

Tran-Thi TA, Haussinger D, Gyufko K, Decker K. Stimulation of prostaglandin release by Ca²⁺-mobilizing agents from the perfused rat liver. A comparative study on the action of ATP, UTP, phenylephrine, vasopressin and nerve stimulation. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988;369:65-68.

Tran-Thi TA, Gyufko K, Decker K. Fate of exogenous and endogenous prostaglandins D2 and E2 in the perfused rat liver. *Eicosanoids* 1991;4:37-46.

Treffkorn L, Scheibe R, Maruyama T, Dieter P. PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF-alpha, ET-1, IL-1alpha, IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2004;74:113-123.

Wu JZ, Ogle CK, Mao JX, Szczur K, Fischer JE, Ogle JD. The increased potential for the production of inflammatory cytokines by Kupffer cells and splenic macrophages eight days after thermal injury. *Inflammation* 1995;19:529-541.

Yi J R LS, Fernandez-Checa J, Kaplowitz N. Expression cloning of a rat hepatic reduced glutathione transporter with canalicular characteristics. *J Clin Investigation* 1994;93:1841-1845.

Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, Chaudry IH. Role of thromboxane in producing hepatic injury during hepatic stress. *Arch Surg* 2005;140:801-807.

Yoshioka M, Ito T, Miyazaki S, Nakajima Y. The release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, interleukin-6 and prostaglandin E2 in bovine Kupffer cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66:301-307.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-162.

Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med* 2008.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 : DIE BILDUNG ZYTOTOXISCHER OXIDANTIEN AUS O_2^{\bullet} UND H_2O_2	2
ABBILDUNG 2 : BILDUNG UND ENTGIFTUNG VON ROS IN DER LEBER.....	8
ABBILDUNG 3: GSH-TRANSPORT/PROTEINE IN SÄUGETIERZELLEN.	9
ABBILDUNG 4: DIE VERMUTETE STRUKTUR DER MRP-PROTEINE	10
ABBILDUNG 5 : ZELLULÄRER AUFBAU DES LEBERPARENCHYMS	14
ABBILDUNG 6: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG EINER KUPFFER´SCHEN STERNZELLE (K) IN EINEM LEBERSINUSOID (S).....	16
ABBILDUNG 7: AKTIVIERUNG VON KUPFFER-ZELLEN DURCH STIMULATION VON TOLL-LIKE- REZEPTOREN (TLR) UND KOMPLEMENT-REZEPTOREN.	18
ABBILDUNG 8: BILDUNG DER PROSTAGLANDINE. DETAILLIERTE BESCHREIBUNG IM TEXT.....	20
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MODELLS DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER.	25
ABBILDUNG 10: VERSUCHSPROTOKOLL ZUR AKTIVIERUNG KUPFFER´SCHER STERNZELLEN IN DER LEBER.	27
ABBILDUNG 11: VERSUCHSPROTOKOLL ZUR UNTERSUCHUNG DES CYCLOOXYGENASE- WEGES.	28
ABBILDUNG 12: VERSUCHSPROTOKOLL ZUR UNTERSUCHUNG DES LIPOXYGENASE- WEGES. DETAILLIERTE BESCHREIBUNG IM TEXT.....	30
ABBILDUNG 13: STIMULATION DER SINUSOIDALEN GSH-AUSSCHIEDUNG NACH INFUSION VON ZYMOBAN.	40
ABBILDUNG 14: KEIN EINFLUß VON ZYMOBAN AUF DIE SINUSOIDALE GSSG-AUSSCHIEDUNG.....	41
ABBILDUNG 15: BILIÄRE GSH-AUSSCHIEDUNG NACH KS-AKTIVIERUNG DURCH ZYMOBAN.....	42
ABBILDUNG 16: GALLEFLUß UND BILIÄRE GSSG-AUSSCHIEDUNG NACH KS-AKTIVIERUNG DURCH ZYMOBAN.	43
ABBILDUNG 17: HEPATISCHE ZELLSCHÄDIGUNG NACH KS-AKTIVIERUNG DURCH ZYMOBAN.	44
ABBILDUNG 18: STIMULATION DER SINUSOIDALEN GSH-AUSSCHIEDUNG DURCH ZYMOBAN: HEMMUNG DURCH FUNKTIONELLE INAKTIVIERUNG DER KS.	45
ABBILDUNG 19: INAKTIVIERUNG DER KS VERMINDERT HEPATISCHE ZELLSCHÄDEN DURCH ZYMOBAN..	46
ABBILDUNG 20: STIMULATION DER SINUSOIDALEN GSH- UND TxB_2 - EFFLUXRATEN DURCH ZYMOBAN.	48
ABBILDUNG 21: STIMULATION DER SINUSOIDALEN GSH- UND PGF_{2A} - EFFLUXRATEN DURCH ZYMOBAN.	49
ABBILDUNG 22: PROSTAGLANDINSYNTHESE: INHIBITOREN UND REZEPTOR-ANTAGONISTEN.	51
ABBILDUNG 23: HEHMUNG DER SINUSOIDALEN GSH-AUSSCHIEDUNG DURCH INDOMETHACIN. ...	52

ABBILDUNG 24: HEMMUNG DER SINUSOIDALEN GSH-AUSSCHIEDUNG DURCH SELEKTIVE COX-I INHIBITION.	53
ABBILDUNG 25: VERMINDERUNG DER DURCH ZYMOZAN VERURSACHTEN HEPATISCHEN ZELLSCHÄDEN DURCH DMSO.	54
ABBILDUNG 26: HEMMUNG DER SINUSOIDALEN GSH-AUSSCHIEDUNG DURCH SELEKTIVE TXA ₂ – SYNTHASE-HEMMUNG.	56
ABBILDUNG 27: HEMMUNG DER SINUSOIDALEN GSH- AUSSCHIEDUNG DURCH SELEKTIVE TXA ₂ – REZEPTORBLOCKADE.	57
ABBILDUNG 28: EFFEKT VON FUREGRELATE UND BM 13.177 AUF HEPATISCHE ZELLSCHÄDEN DURCH AKTIVIERTE KS.	58
ABBILDUNG 29: EFFEKT VON PGF _{2A} UND U-46619 AUF DIE SINUSOIDALE GSH- AUSSCHIEDUNG.	59
ABBILDUNG 30: EFFEKT VON PGF _{2A} UND U-46619 AUF DEN PFORTADERDRUCK.	60
ABBILDUNG 31: EFFEKT VON PGD ₂ UND PGE ₂ AUF DIE SINUSOIDALE GSH- AUSSCHIEDUNG.	61
ABBILDUNG 32: EFFEKT VON PGD ₂ UND PGE ₂ AUF DEN PFORTADERDRUCK.	62
ABBILDUNG 33: HEPATISCHE ZELLSCHÄDEN NACH INFUSION VON PROSTAGLANDINEN.	63
ABBILDUNG 34: LEUKOTRIENE: SYNTHESEHEMMER UND REZEPTORENBLOCKER.	64
ABBILDUNG 35: HEMMUNG DER SINUSOIDALEN GSH- AUSSCHIEDUNG DURCH 5-LPO- INHIBITION.	65
ABBILDUNG 36: HEMMUNG DER SINUSOIDALEN GSH- AUSSCHIEDUNG DURCH CYS-LT ₁ - REZEPTORBLOCKADE.	66
ABBILDUNG 37: EFFEKT VON MK 886 UND LY 171883 AUF HEPATISCHE ZELLSCHÄDEN DURCH AKTIVIERTE KS.	67
ABBILDUNG 38: STIMULATION DER SINUSOIDALEN GSH- AUSSCHIEDUNG DURCH LTC ₄	68
ABBILDUNG 39: HEPATISCHE ZELLSCHÄDIGUNG DURCH LTC ₄	69
ABBILDUNG 40: MIKROVESIKULÄRE VERFETTUNG DER LEBERN HOMOZYGOTER ZUCKER-RATTEN	70
ABBILDUNG 41: VERMINDERTE GSH- AUSSCHIEDUNG VERFETTETER LEBERN.	72
ABBILDUNG 42: INTRAZELLULÄRE GSH- GEHALTE NORMALER UND STEATOTISCHER LEBERN.	73
ABBILDUNG 43: MINIMALE STIMULATION DER SINUSOIDALEN GSH- AUSSCHIEDUNG NACH KS- AKTIVIERUNG IN STEATOTISCHEN LEBERN HOMOZYGOTER ZUCKER-RATTEN.	74
ABBILDUNG 44: STIMULATION DER SINUSOIDALEN TxB ₂ - EFFLUXRATEN NORMALER UND STEATOTISCHER LEBERN DURCH AKTIVIERTE KS.	75
ABBILDUNG 45: STIMULATION DER SINUSOIDALEN PGF _{2A} - EFFLUXRATEN NORMALER UND STEATOTISCHER LEBERN DURCH AKTIVIERTE KS.	76
ABBILDUNG 46 COX-I MEDIIERTE STEIGERUNG DES SINUSOIDALEN GSH-EFFLUXES NACH KS- AKTIVIERUNG.	80

ABBILDUNG 47: POSTULIERTE EFFEKTE DER PROSTAGLANDINE AUF DEN SINUSOIDALEN GSH-
EFFLUX NACH KS- AKTIVIERUNG. 83

ABBILDUNG 48: REGULATION DES HEPATISCHEN GSH-TRANSPORTES DURCH AKTIVIERTE KS :
BETEILIGTE MECHANISMEN. 84

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PRIMÄRER UND SEKUNDÄRER OXIDATIVER SCHUTZ DER ZELLE.....	4
TABELLE 2: EXTRAZELLULÄRE ANTIOXIDANTIEN	5
TABELLE 3: PROSTAGLANDIN-EFFLUXRATEN (PG/MIN X G LEBER) NACH KS- AKTIVIERUNG	50
TABELLE 4: PROSTAGLANDIN- EFFLUXRATEN (PG/MIN X G LEBER) NACH COX- HEMMUNG	55
TABELLE 5 : CHARAKTERISIERUNG ALTERSGLEICHER SPRAGUE-DAWLEY- UND ZUCKER-RATTEN	71

Persönliche Daten

Geburtsdatum	29.05.1979
Geburtsort	Lübeck
Nationalität	Deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

September 1985 - Juli 1989	Grundschule Waldschule Groß Grönau
September 1989 – Juli 1998	Gymnasium Johanneum zu Lübeck
Mai 1999 – April 2006	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians Universität München

Abgelegte Examina

1998	Abitur
März 2002	Physikum
März 2003	1. Staatsexamen
März 2005	2. Staatsexamen
April 2006	3. Staatsexamen

Famulaturen

August – September 2002	Chirurgie-Famulatur, Klinikum Großhadern
August – September 2003	Chirurgie Famulatur, Klinikum Großhadern
Februar – März 2004	Orthopädie Famulatur, Klinik Gersthof Wien
September 2004	Anästhesie-Famulatur, St. Marien Hospital, Lübeck

Praktisches Jahr

1. Tertial	Orthopädische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern
2. Tertial	University of Edinburgh King's College London
3. Tertial	Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern

Beruflicher Werdegang

Juni 2006 - Dezember 2007

Wissenschaftliche Assistentin an der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik,
Universitätsklinikum Großhadern, LMU
(Direktor: Prof. Dr. Dipl. Ing. V. Jansson)

Januar 2008 - Dezember 2009

Rotationsassistentin im Rahmen des
Facharztes für Orthopädie und
Unfallchirurgie an der Chirurgischen Klinik
Universitätsklinik Innenstadt, LMU
(Direktor Prof. Dr. W. Mutschler)

Seit Januar 2010

Wissenschaftliche Assistentin an der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik,
Universitätsklinikum Großhadern, LMU
(Direktor: Prof. Dr. Dipl. Ing. V. Jansson)

Doktorarbeit

Seit Februar 2002

Sinusoidaler Glutathionexport der Leber –
Regulation eines endogenen antioxidativen
Schutzsystems durch aktivierte Kupfer
Zellen
(Medizinische Klinik und Poliklinik II,
Klinikum Großhadern PD Dr. M. Bilzer)

Zusatzqualifikationen

2003-2005

Akupunkturkurs

2003/2004

Sportmedizin-Kurs

2004

Grundkurs Chirurgische Sonographie

2006

Sonographie der Säuglingshüfte

2009

Extremitäten Sonographie

2009

Fachkunde Rettungsmedizin