

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

**Lokomotorische Beeinträchtigung und zerebrokortikaler
oxidativer Stress bei portalvenös ligierten Ratten *in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jonathan Brück
2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Alfons Schnitzler

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Brück J, Görg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Qvartskhava N, Keitel V, Kircheis G, Häussinger D. Locomotor impairment and cerebrocortical oxidative stress in portal vein ligated rats *in vivo*. Journal of Hepatology 2011; 54: 251-257.

Zusammenfassung

Neuere tierexperimentelle Untersuchungen weisen auf eine pathogenetische Relevanz zerebral entzündlicher Prozesse, einer gestörten Glutathomöostase und der Bildung von oxidativem Stress bei hepatischer Enzephalopathie (HE) hin, die im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung von Kognition und Verhalten diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von zerebralem oxidativen Stress auf Verhaltensänderungen bei HE untersucht. Mit der Absicht eine chronische Hyperammonämie herbeizuführen wurde die Entgiftungsleistung der Leber durch partielle Ligatur der Portalvene (PVL) eingeschränkt. Zwei Wochen nach Anlage der PVL wurden signifikant erhöhte Ammoniakkonzentrationen im Blut gemessen. Gleichzeitig wurde im zerebralen Kortex von PVL-Ratten ein signifikanter Anstieg tyrosinnitrierter Proteine (PTN) und oxidiertes RNA gefunden, der vergesellschaftet war mit einer Beeinträchtigung lokomotorischer Aktivität.

Demgegenüber wurde keine erhöhte Expression von Mikrogliaaktivierungsmarkern oder zerebrokortikaler mRNA-Expressionslevel der *pro*-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β nach Anlage einer PVL beobachtet. Lediglich das IL-6-mRNA-Expressionsniveau war signifikant nach Anlage einer PVL erhöht. Auch eine mit entzündlichen Prozessen häufig vergesellschaftete Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) konnte im zerebralen Kortex von PVL-Ratten nicht beobachtet werden.

Auch Veränderungen des Expressionsniveaus der astrozytär exprimierten Glutamattransporter Glutamat-Aspartat-Kotransporter (GLAST) und des glialen Glutamattransporters 1 (Glt-1), welche im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung der Glutathomöostase bei HE diskutiert werden, konnte am Modell der PVL nicht nachgewiesen werden.

Die nach PVL im zerebralen Kortex erhöht vorgefundene Expression der oxidativen Stressmarker PTN und RNA-Oxidation, die IL-6-mRNA-Expressionssteigerung, wie auch die Einschränkung der lokomotorischen Aktivität, nicht jedoch die nach PVL-Anlage beobachtete systemische Hyperammonämie wurden durch die tägliche Verabreichung des Cyclooxygenasehemmstoffs Indomethazin verhindert.

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen hin auf eine Assoziation einer prostanoindabhängigen zerebralen Bildung von oxidativem Stress mit dem Auftreten von Verhaltensänderung nach Anlage einer PVL, einem anerkannten Tiermodell zur hepatischen Enzephalopathie. Eine Beteiligung aktivierter Mikroglia konnte hierbei jedoch nicht nachgewiesen werden.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
8-OH(d)G	8-Hydroxy(desoxy)guanosin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
Ca²⁺	Calcium-Ion
CD68	<i>Cluster of Differentiation</i> 68 (humanes Zelloberflächenantigen)
CFF	kritische Flimmerfrequenz (engl. <i>critical flicker frequency</i>)
COX	Cyclooxygenase
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert (Wert ab dem die Fluoreszenz den Schwellenwert übersteigt)
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EAAT	exzitatorischer Aminosäuretransporter (engl. <i>excitatory amino acid transporter</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraazetat
g	Gramm
G	Gauge
g	Zentrifugalkraft (Vielfaches der Erdbeschleunigung/Erdbeschleunigungskraft)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (engl. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
Glt-1	glialer Glutamat-Transporter 1
h	Stunde(n)
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff (in Wasser gelöst Salzsäure)
HE	hepatische Enzephalopathie
hprt1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1
HRPOD	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IB-4	Isolektin B-4

Iba-1	ionisiertes calciumbindendes Adaptermolekül 1
IE	internationale Einheiten
IFN-γ	Interferon- γ
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
Indo	Indomethazin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ISHEN	<i>International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
MEZ	Mitteuropäische Zeit
mg	Milligramm
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex II (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
mHE	geringgradige hepatische Enzephalopathie
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mol	Mol
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
n.s.	nicht signifikant
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid (in Wasser gelöst Natronlauge)
NGS	normales Ziegenserum (engl. <i>normal goat serum</i>)
NH₄Ac	Ammonium-Azetat
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase

NO₂Tyr	Nitrotyrosin
O₂	Sauerstoff
OP	Operation
PAA	Polyacrylamid
PBR	peripherer Benzodiazepinrezeptor
PCA	portocavale Anastomose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert (Maß für sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung)
PNM	perineurale Netz-Matrix
PTN	Protein-Tyrosin-Nitrierung
PVL	portalvenöse Ligatur (hier synonym für partielle portalvenöse Ligatur)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNS	reaktive Stickstoffspezies (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SFB	Sonderforschungsbereich
Sham	scheinoperierte Kontrollen
SSC	Kochsalz-Citrat (engl. <i>saline-sodium citrate</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 Zusatz
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt
V.	Vena
WB	Western Blot
WFA	<i>Wisteria floribunda</i> -Agglutinin
ZNS	Zentralnervensystem
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Hepatische Enzephalopathie	1
1.2	Tiermodelle zur hepatischen Enzephalopathie	3
1.3	Glutamat und Glutamin bei der hepatischen Enzephalopathie	4
1.4	Astrozytenschwellung und oxidativer Stress bei hepatischer Enzephalopathie	6
1.5	Protein-Tyrosin-Nitrierung und RNA-Oxidation bei hepatischer Enzephalopathie	8
1.6	Prostanoidsynthesehemmung und hepatische Enzephalopathie	10
1.7	Neuroinflammation bei hepatischer Enzephalopathie	10
1.8	Zielsetzung der Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1	Materialien, Substanzen und Lösungen	12
2.2	Tiere	14
2.3	Verabreichung von Indomethazin	14
2.4	Einstellung einer akuten Hyperammonämie <i>in vivo</i>	15
2.5	Verabreichung von LPS <i>in vivo</i>	16
2.6	Operationstechnik und Probengewinnung	16
2.7	Erfassung der lokomotorischen Aktivität	17
2.8	Bestimmung des Blutammoniakspiegels	17
2.9	Western-Blot Analyse	17
2.10	Northwestern-Blot Analyse	18
2.11	Densitometrische Auswertung	19
2.12	Immunhistochemie	19
2.13	Analyse der Zytokin-mRNA-Expression durch quantitative reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR)	20
2.14	Auswertung der Ergebnisse	21
3.	Ergebnisse	22
3.1	Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf Blutammoniakkonzentration, Körperwachstum, sowie Leber- und Milzgewicht	22
3.2	Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf die Expression von mit oxidativem Stress assoziierten Proteinen und der Oxidation von RNA	23

3.3	Effekt einer portalvenösen Ligatur auf die mRNA-Expression <i>pro-</i> inflammatorischer Zytokine im zerebralen Rattenkortex	27
3.4	Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf den Aktivierungszustand von Mikroglia	28
3.5	Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf die lokomotorische Aktivität der Ratte und Wirkung von Indomethazin.....	30
4.	Diskussion	33
4.1	Oxidativer/nitrosativer Stress im Modell der portalvenösen Ligatur	33
4.2	Neuroinflammation bei hepatischer Enzephalopathie	34
4.3	Glutamathomöostase bei hepatischer Enzephalopathie.....	36
4.4	Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf lokomotorisches Verhalten.....	37
5.	Literaturverzeichnis	39
6.	Anhang	46

1. Einleitung

1.1 Hepatische Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie (HE) repräsentiert eine prinzipiell reversible, neuropsychiatrische Störung im Zusammenhang mit akutem oder chronischem Leberversagen. Charakterisiert ist sie durch beeinträchtigte (Fein-)Motorik, kognitive Defizite, sowie Störungen von Emotion, Affekt und Verhalten, wie z. B. Änderungen des physiologischen Schlaf-Wach-Rhythmus [Häussinger *et al.* 2007]. Die HE ist eine häufige Komplikation der Leberzirrhose [Herold *et al.* 2007]. Epidemiologische Untersuchungen geben eine Koinzidenz von ca. 80 % an [Bajaj 2008].

In Europa und USA kommen jährlich mehr als 2,6 Mio. Betroffene hinzu (Inzidenz ca. 250/100 000/Jahr) [Herold *et al.* 2007]. Etwa 1,5-2,5 Mio. Menschen in Deutschland leiden an chronischen Lebererkrankungen, wobei sich schätzungsweise 2/3 aller Fälle davon im Endstadium ihrer Erkrankung befinden [Bühringer *et al.* 2000]. Bei fortschreitender Leberzirrhose ist die zunehmend kompromittierte Entgiftungsfähigkeit der Leber von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der HE. Die Leber metabolisiert auf Grund struktureller Schäden insuffizient und es kommt zur Ausbildung portosystemischer Umgehungskreisläufe, sodass das Blut nicht mehr von toxischen Metaboliten wie z. B. Ammoniak, Mercaptanen, Phenolen, Fettsäuren, Gamma-Aminobuttersäure und endogene Benzodiazepinen ausreichend entgiftet wird [Herold *et al.* 2007]. In der Folge bildet sich eine hepatische Enzephalopathie aus mit charakteristischen Beeinträchtigungen des ZNS, wie z. B. kognitive, motorische und perzeptive Störungen. Je nach Schweregrad wird hierdurch die Lebensqualität deutlich vermindert [Groeneweg *et al.* 1998, Kircheis *et al.* 2002, Wein *et al.* 2004]. Während bei chronischen Lebererkrankungen, z. B. der alkoholischen Leberzirrhose oder einer Zirrhose bei chronischer Virushepatitis, vornehmlich eine Neurodepression als HE-Symptom klinisch apparent wird, ist die akute Ammoniakintoxikation mit Neuroexzitation und Konvulsionen assoziiert [Häussinger *et al.* 2007]. Änderungen der motorischen Funktionen bei Zirrhosepatienten mit HE wurden einer abnormen thalamokortikalen und kortikomuskulären Synchronisation zugeschrieben [Häussinger *et al.* 2007].

Für die klinische Praxis ist eine Beurteilung des Schweregrades der HE von entscheidender Bedeutung. Klinische Symptome reichen von Beeinträchtigung der

Vigilanz, Veränderung der Persönlichkeit, Störung des Bewusstseins, der Aufmerksamkeit und der Konzentrationsfähigkeit, sowie motorischen Störungen bis hin zu Koma und Tod [Bacon *et al.* 2009, Ferenci *et al.* 2002]. Beispielsweise finden sich Orientierungsstörungen zu Zeit und Raum, retardiertes Reaktionsverhalten, kognitive Defizite wie Erinnerungslücken und Unfähigkeit zu Rechnen, sowie Veränderungen im Schreibstil und komplexere motorische Störungen in Form eines grobschlägigen Flattertremors (Asterix) [Ferenci *et al.* 2002]. Anhand verschiedener Parameter wurde eine Einteilung in minimale HE und manifeste HE (Grad I-IV nach den West Haven-Kriterien) [Ferenci *et al.* 2002] oder auch vereinfachend in „High-grade HE“ gegenüber „Low-grade HE“ vorgenommen [Häussinger *et al.* 2006] (Tabelle 1). Letztere unterliegt bei der Beurteilung des Schweregrades weniger systematischen Fehlern, die durch eine untersucherabhängige Subjektivität und die häufig kaum mögliche Abgrenzbarkeit der milden HE-Grade zustande kommen [Häussinger *et al.* 2008]. Im Gegensatz zur Beurteilung des HE-Schweregrades mittels psychomotorischen Testbatterien konnte sich die kritische Flimmerfrequenz (CFF) als ein objektiver und reproduzierbarer Parameter zu Beurteilung einer geringgradigen HE etablieren [Kircheis 2002 *et al.*, Sharma *et al.* 2010].

Tabelle 1. Schweregrade der hepatischen Enzephalopathie (HE) nach Häussinger *et al.* 2006 u. 2008 und Ferenci *et al.* 2002.

minimale HE (mHE)	keine klinischen Symptome, jedoch eingeschränkte Lebensqualität; Defizite in neuropsychologischen und -physiologischen Tests, objektivierbar durch die kritische Flimmerfrequenzanalyse nach Kircheis <i>et al.</i> 2002	
manifeste HE	klinische Symptome unterschiedlicher Schweregrade, Einteilung nach den West Haven-Kriterien in Grad I-IV nach Ferenci <i>et al.</i> 2002	
	Grad I	Euphorie oder Ängstlichkeit; Aufmerksamkeitsdefizite; Schwierigkeiten beim Addieren
	Grad II	Lethargie oder Apathie; minimale zeitliche und/oder räumliche Desorientierung; subtile Persönlichkeitsstörungen; unangepasstes Verhalten; Schwierigkeiten beim Subtrahieren
	Grad III	Somnolenz bis Stupor; vorhandene Reaktion auf akustische Reize; Verwirrtheit: zeitliche und/oder räumliche Desorientierung
	Grad IV	Koma; keine Reaktion auf akustische Reize oder Schmerzstimuli

Fortsetzung Tabelle 1. Schweregrade der hepatischen Enzephalopathie (HE) nach Häussinger *et al.* 2006 u. 2008 und Ferenci *et al.* 2002.

„Low-grade HE“	beschreibt kooperative Patienten mit Zirrhose; objektive, reproduzierbare und quantifizierbare Test wie Computerpsychometrie und CFF erlauben weitere Schweregradeinstufung; kein Erfordernis einer stationären Aufnahme; früher kategorisiert in mHE, HE I, HE II
„High-grade HE“	umfasst die Patienten, welche unfähig zur Kooperation sind und sich desorientiert, somnolent oder komatös präsentieren, z. B. HE III / IV

1.2 Tiermodelle zur hepatischen Enzephalopathie

Pathogenetisch ist bei der HE ein erhöhter portosystemischer Shuntblutfluss bedeutsam und die Ausbildung portosystemischer Kollateralen stellt eine der Hauptkomplikationen der portalen Hypertension dar [Bosch *et al.* 2000]. Die Leberzirrhose ist die häufigste Ursache einer portalen Hypertension in den westlichen Ländern und bei mehr als 60 % der Leberzirrotiker besteht auch eine klinisch bedeutsame portale Hypertension [Bacon *et al.* 2009]. Diese ist definiert als eine Erhöhung des hepatovenösen Druckgradienten über 5 mmHg und bedingt durch einerseits erhöhten Widerstand im intrahepatischen Stromgebiet (meist zirrhotischem Umbau) und andererseits gesteigertem Blutfluss im Splanchnikusgebiet [Bacon *et al.* 2009, Rodríguez-Vilarrupla *et al.* 2007]. In der Folge hypertrophiert die Milz [Bacon *et al.* 2009] und es kommt zur Ausbildung von deutlichen Kollateralgefäße im Abdomen und einem portosystemisches Shuntblutvolumen von 90-95 % des portalen Blutflusses [Chojkier *et al.* 1981, Rodríguez-Vilarrupla *et al.* 2007].

Diese Veränderungen werden in Tiermodellen zur HE durch operative Anlage eines Umgehungskreislaufes (portocavale Anastomose, PCA), oder partielle Ligatur der Pfortader (PVL) nachgeahmt. Die PVL und PCA eignen sich daher zum Studium der Auswirkungen einer reduzierten Blutentgiftung durch die Leber auf Hirnfunktionen wie sie bei hepatischer Enzephalopathie auftritt [Butterworth *et al.* 2009, García-Moreno *et al.* 2005]. Betrachtet man das Ausmaß einer Leberatrophie, so lässt sich ein quantitativer Unterschied zwischen beiden Modellen feststellen. Nach Anlage einer PVL atrophiert die Leber auf durchschnittlich 84 % ihrer Ursprungsgröße, wohingegen bei der PCA bis zu 50%ige Reduktion verzeichnet wurde [Lopez *et al.* 2003]. Beide Modelle bewirken in unterschiedlichem Ausmaß eine Erhöhung der systemischen Ammoniakkonzentrationen.

Während bei der PVL eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ beschrieben wurde [Scorticati *et al.* 2006], kommt es nach Anlage einer PCA zu einem Anstieg von bis zu 149 $\mu\text{mol/l}$ [Bjerring *et al.* 2011]. Es ist daher postuliert worden, dass die Anlage einer PVL dem klinischen Bild der minimalen HE entspricht [Butterworth *et al.* 2009, Scorticati *et al.* 2001]. Sowohl die PVL als auch die PCA wurden kategorisiert als Tiermodelle für die hepatische Enzephalopathie bei chronischer Leberfunktionsstörung basierend auf portosystemischem Shunting (Typ B HE) [Butterworth *et al.* 2009]. Beim Modell der PCA wurde als weiteres Merkmal beschrieben, dass Unterernährung und verminderte Nahrungsaufnahme im Langzeitversuch auftreten [Butterworth *et al.* 2009, Dejong *et al.* 1993], was über die PVL bislang so nicht berichtet wurde.

1.3 Glutamat und Glutamin bei der hepatischen Enzephalopathie

Beeinträchtigungen der kognitiven und motorischen Funktionen, ähnlich denen von Patienten mit hepatischer Enzephalopathie, werden sowohl nach Anlage einer PVL wie auch einer PCA im Tiermodell beobachtet [Butterworth *et al.* 2009]. Dies betrifft bei beiden Modellen den Verlust von Aktivität, Veränderungen im Tag-Nacht-Rhythmus, Hypokinesie, Hyperammonämie, erhöhte Spiegel von Ammoniak und Glutamin im Gehirn, sowie – bislang nur im Modell der PCA beobachtet – ein vermindertes Gedächtnis- und Lernvermögen [Butterworth *et al.* 2009]. Bei den portocaval anastomosierten Ratten wurde die veränderte thalamokortikale Neurotransmission, welche zu Hypokinesie und beeinträchtigtem Lernvermögen führte, durch erhöhte extrazelluläre Glutamatspiegel vermittelt. Eine pharmakologische Hemmung der zerebralen Prostanoidsynthese durch Ibuprofen bewirkte nicht nur eine Normalisierung der extrazellulären Glutamatspiegel, sondern verhinderte auch die Beeinträchtigung kognitiver Funktionen in den portocaval anastomosierten Ratten [Cauli *et al.* 2006 u. 2007 u. 2009b]. Es wurde daher vermutet, dass eine pharmakologische Hemmung von Cyclooxygenasen (COX) bei HE therapeutisch bedeutsam sein könnte. Da die HE eng vergesellschaftet ist mit einer erhöhten Inzidenz für Nierenkomplikationen (hepatorenales Syndrom), ist eine Therapie mit COX-Hemmstoffen kontraindiziert [Ben Chaabane *et al.* 2011]. Darüber hinaus induziert Ammoniak eine prostanoidabhängige Exozytose von Glutamat aus kultivierten Astrozyten. Diese Glutamatfreisetzung ist wiederum eng assoziiert mit der Bildung von reaktiven Sauerstoff-

und Stickstoffspezies (ROS und RNS), welche zu einer Oxidation von RNA führen [Görg *et al.* 2008 u. 2010a].

Neben einer vermehrten Freisetzung führt auch eine verminderte Clearance zu einer Störung der Glutathomöostase. Die Clearance extrazellulärer Glutamatspiegel wird überwiegend durch die glialen Glutamattransporter Glt-1 und GLAST bewerkstelligt [Rothstein *et al.* 1996] und Störungen der Expression sind assoziiert mit einigen zentralnervösen Erkrankungen wie z. B. zerebraler Ischämie, Amyotropher Lateralsklerose, Morbus Alzheimer, Epilepsie und traumatischen Hirnschäden [Rothstein *et al.* 1996, Danbolt 2001]. Ammoniak könnte dafür verantwortlich sein, dass nicht nur die synaptische Glutamat-Expression sondern auch die Glutamat-Clearance gestört wird. Studien zeigen, dass er die Glutamattransporteraktivität in Astrozyten senkt [Suarez *et al.* 2000, Michalak *et al.* 1997]. Studien an kultivierten Astrozyten *in vitro* und HE-relevanten Tiermodellen *in vivo* unterstützen die Auffassung, dass eine gestörte zerebrale Glutathomöostase pathophysiologisch relevant ist für die Genese der HE [Hermenegildo *et al.* 1996, Knecht *et al.* 1997, Suarez *et al.* 2000, Rose 2007]. In vielen Arbeiten wurde eine enge Beziehung zwischen Ammoniakintoxikation, Astrozytenschwellung und oxidativem Stress gezeigt, in der Glutamat eine bedeutsame Rolle in einem sich selbst verstärkenden Mechanismus zwischen oxidativem und osmotischem Stress zukommt [Häussinger *et al.* 2010, Schliess *et al.* 2002 u. 2004, Görg *et al.* 2010a].

Astrozyten stellen die Mehrheit der Gliazellen im ZNS dar und erfüllen eine wichtige Funktion beim Aufbau der Blut-Hirn-Schranke [Abbot 2002]. Zudem spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Ammoniakentgiftung im Gehirn, da sie im ZNS nahezu alleinig die Glutamin-Synthetase exprimieren [Norenberg *et al.* 1979]. Im Hirn anfallender Ammoniak wird von der Glutamin-Synthetase zu Glutamin metabolisiert, welches im Astrozyten akkumuliert und dadurch eine Zellschwellung herbeiführt [Brusilow *et al.* 2010, Mardini *et al.* 2011]. Die Glutamin-vermittelte Astrozytenschwellung wird begleitet von einer volumenregulatorischen Freisetzung organischer Osmolyte [Häussinger *et al.* 1994]. Unter dem Einfluss weiterer schwellungsvermittelnder HE-auslösender Faktoren kann es dann zu einer Erschöpfung des volumenregulatorischen Potentials der Astrozyten kommen (Abb. 1) [Häussinger *et al.* 2007 u. 2008].

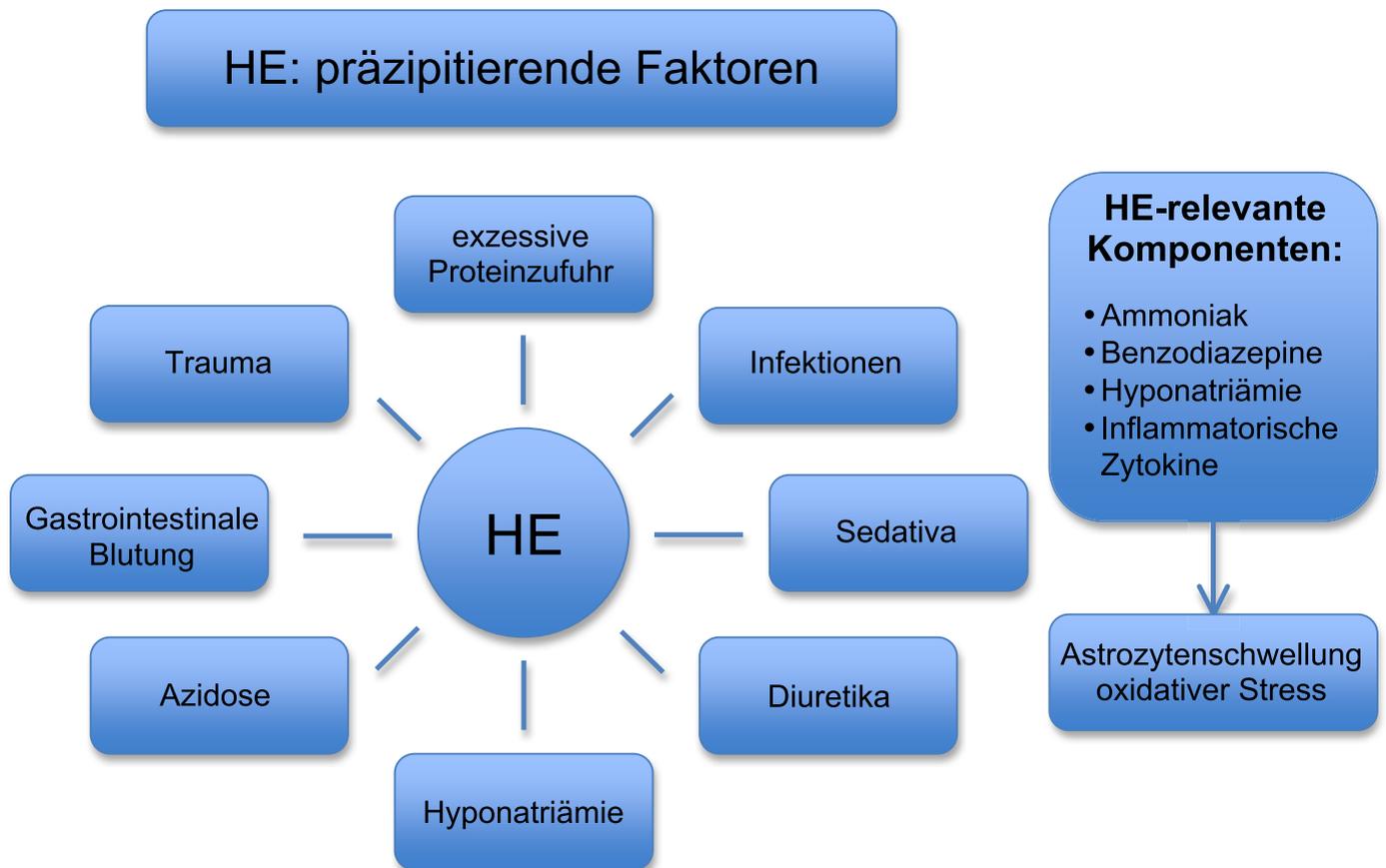


Abb. 1. Faktoren, welche eine hepatische Enzephalopathie präzipitieren nach Häussinger *et al.* 2008. Die HE wird durch eine heterogene Gruppe von Faktoren präzipitiert. Ein integratives Element aller Faktoren ist, dass sie eine Astrozytenschwellung und oxidativen Stress in Astrozyten auslösen. Während einige Faktoren den Ammoniakspiegel erhöhen, wie z. B. gastrointestinale Blutungen oder exzessive Proteinzufuhr, bewirken andere eine Störung der Osmolythomöostase, wie z. B. Diuretika oder eine Azidose.

1.4 Astrozytenschwellung und oxidativer Stress bei hepatischer Enzephalopathie

Die erstmals von Häussinger aufgestellte „Swelling-Hypothese“, die inzwischen international anerkannt ist, integriert die Wirkung einer heterogenen Gruppe von HE-auslösenden Faktoren auf Ebene der Induktion einer Zellschwellung. Hierbei kommt es in einem sich selbst verstärkenden Kreislauf zwischen osmotischem und oxidativem/

nitrosativem Stress zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (Abb. 2). In der Folge wird die Astrozytenfunktion auf verschiedenen Ebenen beeinträchtigt, z. B. durch kovalente Modifikation von Proteinen und RNA, Veränderung von Signalkaskaden und Genexpressionsmuster. Die Gesamtheit dieser Mechanismen bewirkt eine Störung neuronaler Funktionsabläufe, welche sich schließlich in der neuropsychiatrischen Symptomatik der hepatischen Enzephalopathie manifestieren [Häussinger *et al.* 2007 u. 2008].

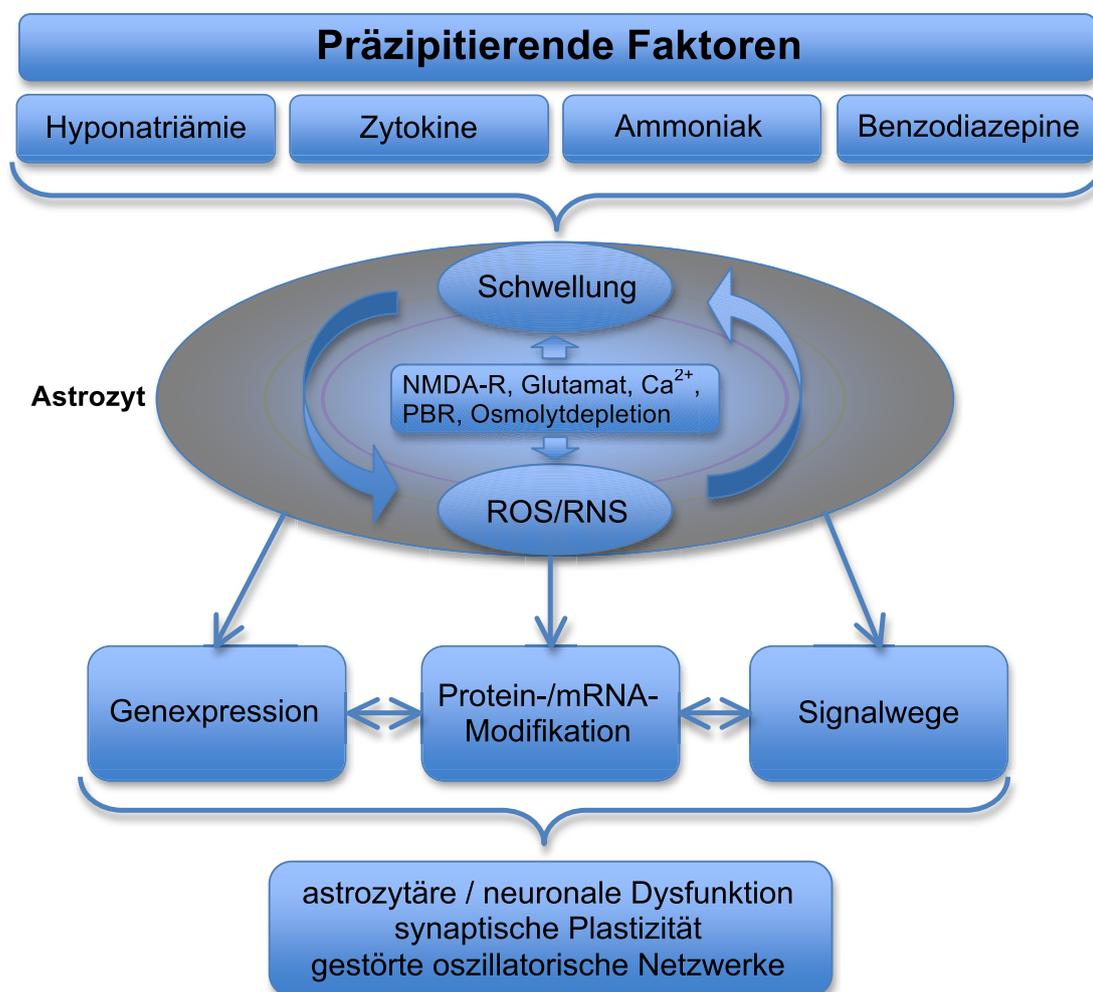


Abb. 2. Astrozytenschwellung und Bildung von reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies bedingen und verstärken sich gegenseitig („Swelling-Hypothese zur hepatischen Enzephalopathie“ nach Häussinger *et al.* 2008). Die Wirkung verschiedener HE-auslösender Faktoren konvergiert auf der Ebene einer Zellschwellung und der Induktion von oxidativem Stress. In der Folge werden glioneuronale Kommunikation und synaptische Plastizität beeinträchtigt und oszillatorische Netzwerke gestört. ROS: reaktive Sauerstoffspezies; RNS: reaktive Stickstoffspezies; PBR: peripherer Benzodiazepinrezeptor

1.5 Protein-Tyrosin-Nitrierung und RNA-Oxidation bei hepatischer Enzephalopathie

ROS/RNS können Proteine posttranslational [Görg *et al.* 2010b] und Nukleinsäuren posttranskriptionell modifizieren [Kong *et al.* 2010]. Eine Möglichkeit, wie Proteine modifiziert werden können, stellt die Protein-Tyrosin-Nitrierung dar (Abb. 3) [Ischiropoulos 2003]. Eine prinzipielle funktionale Konsequenz dieser Proteinmodifikation kann jedoch nicht abgeleitet werden. Es wurden sowohl gesteigerte Enzymaktivitäten und erhöhte Rezeptor-Liganden-Bindungsaffinitäten beschrieben, wie auch eine Verminderung dieser. In einigen Fällen konnte außerdem keine funktionale Bedeutung der Protein-Tyrosin-Nitrierung (PTN) nachgewiesen werden [Savvides *et al.* 2002, Ji *et al.* 2006, Ischiropoulos 2009, Gole *et al.* 2000]. Einige Studien deuten auf eine Reversibilität der PTN hin [Gow *et al.* 1996] und legen dieser eine Rolle bei Signalkaskaden ähnlich einer Phosphorylierung nahe [Gow *et al.* 1996, Greenacre *et al.* 2001]. Allgemein akzeptiert ist die Auffassung, dass Peroxinitrit ein Hauptmediator der Tyrosinnitrierung ist [Ischiropoulos 2003 u. 2009, Savvides *et al.* 2002, Ji *et al.* 2006, Gole *et al.* 2000, Gow *et al.* 1996, Greenacre *et al.* 2001]. Daneben wurden enzymatische Nitrierungsreaktionen beschrieben. Diskutiert werden Myeloperoxidase (MPO) und möglicherweise weitere Hämoproteine, welche Tyrosin als Substrat verwenden [Ischiropoulos 1998].

In Zellkulturexperimenten an isolierten Rattenastrozyten und im Rattenhirn *in vivo* konnte gezeigt werden, dass eine PTN durch HE präzipitierende Faktoren ausgelöst werden kann [Schliess *et al.* 2002 u. 2004, Görg *et al.* 2006, Häussinger *et al.* 2005].

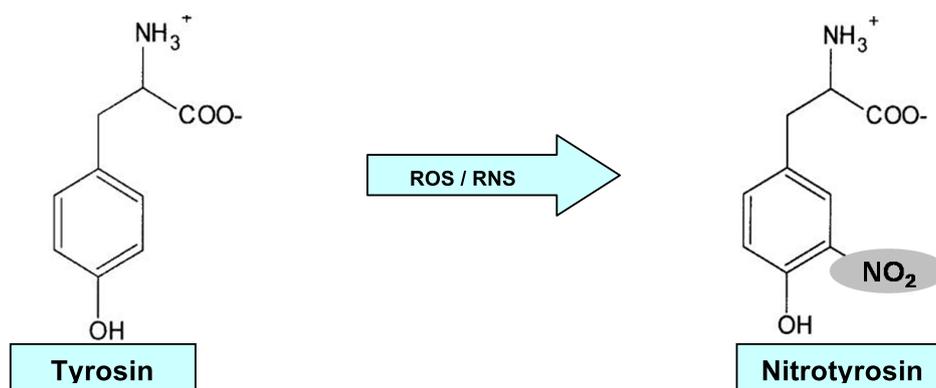


Abb. 3. Nitrierung von Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoff-/Stickstoffspezies (ROS / RNS). Bei dieser elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktion ersetzt die Nitrogruppe das Proton an der 3' Position des Phenolrings von L-Tyrosin.

ROS und RNS können auch RNA-Spezies posttranskriptionell oxidieren (Abb. 4) [Görg *et al.* 2008]. RNA ist vulnerabler gegenüber einer Oxidation verglichen mit DNA, da sie nicht durch Hitzeschock-Proteine und Histone geschützt wird. RNA liegt in der Zelle außerdem einzelsträngig vor und wird im Zytosol exprimiert, wo sie für Radikale besser zugänglich ist [Hofer *et al.* 2006]. Konsequenzen der RNA-Oxidation können eine gestörte Translation und eine Beeinträchtigung der Proteinsynthese sein, die zum Zelluntergang führen kann. RNA-Oxidation scheint in der Frühphase bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zu spielen und wurde u. a. bei Alzheimer, Parkinson, Amyotropher Lateralsklerose, Epilepsie und kürzlich auch im Gehirn von Patienten mit hepatischer Enzephalopathie beschrieben [Görg *et al.* 2010b, Kong *et al.* 2010].

Vermehrte RNA-Oxidation wurde auch in zerebrokortikalen Neuronen akut ammoniakintoxizierter Ratten festgestellt. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass die RNA-Oxidation in Neuronen die aktivitätsabhängige Proteinsynthese, welche für synaptische Plastizität essentiell ist, stören konnte [Görg *et al.* 2008]. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass eine RNA-Oxidation-vermittelte Störung synaptischer Plastizität den neurologischen Symptomen bei HE zugrunde liegen könnte.

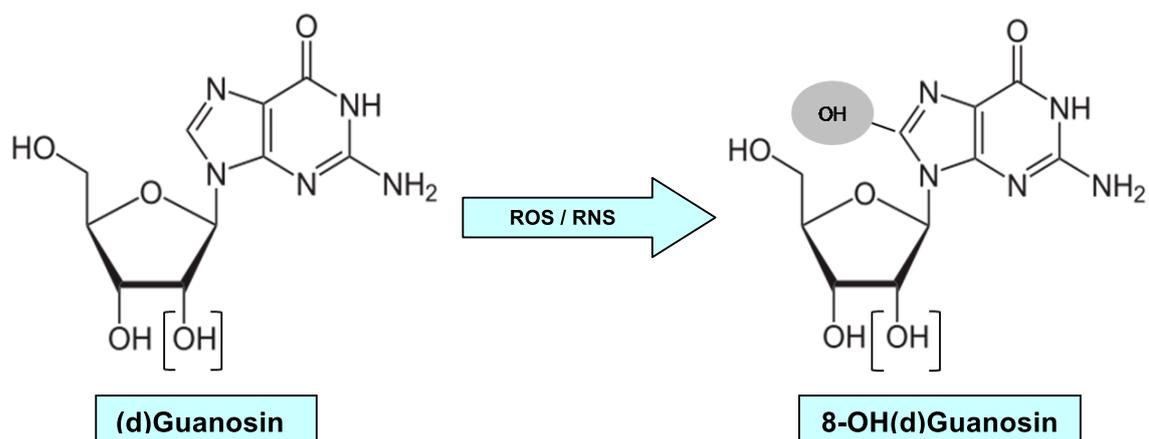


Abb. 4. Oxidation von (d)Guanosin zu 8-OH(d)Guanosin unter dem Einfluss reaktiver Sauerstoff- / Stickstoffspezies (ROS / RNS). Bei dieser nukleophilen Additionsreaktion wird an 8' Position des Guanin-Heterocylus' eine Hydroxygruppe hinzugefügt (Hydroxylierung).

1.6 Prostanoidsynthesehemmung und hepatische Enzephalopathie

Viele Arbeiten haben sich mit der Bedeutung von Prostanoiden bei der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie beschäftigt. Dabei wurde den vasodilatatorischen und inflammatorischen Eigenschaften dieser Verbindungen eine Rolle in der Pathogenese der HE beigemessen [Jiang *et al.* 2009, Chang *et al.* 2011]. So wurde im frontalen Kortex in HE Tiermodellen eine erhöhte Expression der *pro*-inflammatorischen Zytokine Il-1 β , Il-6 und TNF- α gemessen [Jiang *et al.* 2009]. Diese Erkenntnisse führten zu Studien mit der Zielsetzung, die Hemmung der COX-vermittelten Prostanoidsynthese im Hinblick auf ihre Auswirkung auf die hepatische Enzephalopathie zu untersuchen. Die Verwendung von unspezifischen COX-Inhibitoren wie Ibuprofen oder Indomethazin brachte unterschiedliche Resultate bei verschiedenen HE Tiermodellen: nach Anlage einer PCA in der Ratte wurde eine signifikante Verbesserung einer HE-assoziierten Symptomatik erzielt [Cauli *et al.* 2009b], bei gallengangsligierten Ratten ergab sich hingegen kein verbessernder Effekt [Chan *et al.* 2006], wohingegen Ratten im durch Thioacetamid induzierten fulminanten Leberversagen eine Verschlimmerung des Leberschadens und der HE erlitten [Chu *et al.* 2005]. In letztgenanntem Modell zeigte eine selektive Hemmung der COX1-Isoform wiederum einen vorteilhaften Effekt in Bezug auf Überleben und die hepatische Enzephalopathie [Chang *et al.* 2011]. Vergleichbare Studien zum Modell der portalvenösen Ligatur liegen bislang nicht vor.

1.7 Neuroinflammation bei hepatischer Enzephalopathie

Neben Astrozyten [Görg *et al.* 2010a] repräsentiert auch aktivierte Mikroglia im ZNS eine bedeutende Quelle für Prostaglandine und *pro*-inflammatorische Zytokine. Eine Mikrogliaaktivierung im ZNS wurde bei Ratten im akuten Leberversagen, herbeigeführt durch Leberarterienligatur, sowie bei gallengangsligierten Ratten nachgewiesen [Jiang *et al.* 2009, Rodrigo *et al.* 2010]. Neuere Untersuchungen an Mikrogliaulturen, mit ammoniumazetatbelasteten Ratten und an *postmortem* Hirnbiopsien von Leberzirrhosepatienten mit HE zeigten, dass Ammoniak an sich schon eine *Aktivierung* von Mikroglia induzieren kann. Die aktivierte Mikroglia produzierte aber keine inflammatorischen Komponenten, wie z. B. *pro*-inflammatorische Zytokine, Prostanoid

und zeigte auch keine verstärkte Phagozytose. Dies lässt vermuten, dass Ammoniak nicht zur Ausbildung eines „reaktiven“ Mikroglia-Phänotyps beiträgt. Auch im Gehirn akut ammoniakbelasteter Ratten und von Patienten mit HE konnten keine erhöhten Zytokinspiegel gefunden werden [Zemtsova *et al.* 2011].

Zwischen den verschiedenen Tiermodellen wurden inkonsistente Befunde publiziert: Ratten nach Leberarterienligatur im akuten Leberversagen zeigten erhöhte Konzentrationen *pro*-inflammatorischer Zytokine im zerebralen Cortex [Jiang *et al.* 2009]. Im zerebralen Cortex portocaval anastomosierter Ratten wurde eine erhöhte Il-6-Konzentration sowie COX- und iNOS-Aktivität bei unveränderter TNF- α -Konzentration gemessen [Cauli *et al.* 2007]. Im Modell der gallengangsligierten Ratte fanden sich erhöhte Level von Il-1 β , iNOS und Prostaglandin E2 [Rodrigo *et al.* 2010]. Akut ammoniakbelastete Ratten wiesen unveränderte Mikrogliaaktivierungsmarker und keine gesteigerte Expression von iNOS-, COX-2- und *pro*-inflammatorischer Zytokin-mRNA auf [Zemtsova *et al.* 2011]. Bei Patienten mit HE konnte eine Mikrogliaaktivierung nachgewiesen werden, aber keine erhöhte zerebrokortikale Expression *pro*-inflammatorischer Zytokin-mRNA und Proteine [Zemtsova *et al.* 2011]. Bislang liegen keine Daten zum Modell der portalvenösen Ligatur vor.

Die Verwendung der Begriffe „Mikrogliaaktivierung“ und „Neuroinflammation“ ist nicht ganz unproblematisch, da in der Literatur keine einheitliche und allgemeingültige Definition etabliert ist. So wird beispielsweise postuliert, dass Mikroglia immer *aktiv* sind und eine Überwachungsfunktion im ZNS erfüllen. Als Folge unterschiedlicher Stimuli jedoch kann sie *aktiviert* zu erhöhter Wachsamkeit in verschiedener Ausprägung sowohl neuroprotektiv als auch neurodegenerativ wirken [Kettenmann *et al.* 2011].

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer partiellen portalvenösen Ligatur in der Ratte *in vivo* auf die zerebrale Bildung von oxidativem Stress und die Lokomotorik zu überprüfen.

Es sollte untersucht werden, ob eine Mikrogliaaktivierung und eine zerebrale Bildung *pro*-inflammatorischer Faktoren wie Zytokine und Prostanoiden in diese Prozesse involviert sind.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien, Substanzen und Lösungen

Primärantikörper

8-Hydroxyguanosin (8-OH(d)G), monoklonal	QED Biosciences, San Diego, CA, USA
β -Aktin, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK
CD68, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK
glialer Glutamat-Transporter (Glt-1), polyklonal	Merck, Bad Soden, Deutschland
Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST), polyklonal	Tocris-Bioscience, Ellisville, USA
Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), monoklonal	Biodesign International, Saco, USA
induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Iba-1, polykonal	WAKO Chemicals, Neuss, Deutschland
Isolektin B-4 (IB-4) aus <i>Banderia simplicifolia</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
MHC-Klasse II, monoklonal	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
neuronentypische Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS), polyklonal	großzügiges Geschenk von Dr. Bernd Mayer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Graz, Österreich) [Referenz: Görg et al. 2006]
Nitrotyrosin (NO ₂ Tyr), monoklonal	Upstate Biotechnology, Millipore, Schwalbach, Deutschland
<i>Wisteria floribunda</i> Agglutinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Sekundärantikörper

Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper	Jackson Corp., West Grove, USA
HRPOD-Anti Kaninchen Zweitantikörper	DAKO, Hamburg, Deutschland
HRPOD-Anti Maus Zweitantikörper	BioRad, München, Deutschland

Chemische Substanzen

Indo EDO (Indomethazin)	Chauvin-ankerpharm, Berlin, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Liquemin N (Heparin-Natrium)	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Nacoren (Pentobarbital-Natrium)	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Rimadyl (Carprofen)	Pfizer, Berlin, Deutschland

Feinchemikalien

Ammonium-Azetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bradford Protein Assay	BioRad, München, Deutschland
BSA	PAA-Laboratories, Linz, Österreich
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
IFN- γ	BioSource International, Camarillo, USA
Il-1 β	Roche, Mannheim, Deutschland
LPS	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim, Deutschland
QuantiTect reverse Transkription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNeasy mini Kits	Qiagen, Hilden, Deutschland
TNF- α , human, rekombinant	Roche, Mannheim, Deutschland

Triton-X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Western-Lightning™ Chemilumineszenz	
Reagens Plus	PerkinElmer, Waltham, USA
Ziegen Serum (NGS)	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.2 Tiere

Alle Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 160 g durchgeführt. Die Ratten wurden individuell gehalten bei freiem Zugang zu Futter und Wasser ad libitum und einem 12 h Lichtzyklus (06.00 Uhr bis 18.00 Uhr MEZ) sowie kontrollierter Atmosphäre. Vier Tiergruppen wurden gebildet: 15 scheinoperierte Tiere (Sham) und 11 partiell portalvenös ligierte (PVL) Ratten, sowie sieben scheinoperierte Ratten, welche eine tägliche subkutane Indomethazin-Injektion (2,5 mg/kg KG, Indo EDO) erhielten und sieben partiell portalvenös ligierte Tiere welche eine tägliche subkutane Indomethazin-Injektion erhielten. Die Indomethazin-Behandlung wurde am Operationstag begonnen (5 Stunden nach OP). Die an Kontrollen verabreichte wirkstofffreie Trägerlösung zeigte keinerlei Effekt.

Alle unternommen Experimente an Versuchstieren erhielten die nach §8 Absatz 1 Tierschutzgesetz erforderliche Genehmigung (Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.306, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Nordrhein-Westfalen).

Die erforderliche Versuchstierkunde wurde durch die Teilnahme an einem von der Gesellschaft für Versuchstierkunde zertifizierten Kurs der Kategorie B nach den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* erworben.

2.3 Verabreichung von Indomethazin

Die Wirkung von Indomethazin auf die lokomotorische Aktivität portocaval anastomosierter Ratten (PCA) wurde bereits bei Ahboucha *et al.* 2008 beschrieben. In dieser Arbeit wurde Indomethazin in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und einmalig zwei Stunden vor Messung der lokomotorischen Aktivität in verschiedenen Konzentrationen intraperitoneal injiziert. Eine Dosierung von 5 mg/kg KG konnte die

durch PCA induzierte Störung lokomotorischer Aktivität aufheben. Der Reinstoff Indomethazin *per se* ist nahezu wasserunlöslich im Gegensatz zum neu zusammengesetztem Indomethazinnatriumtrihydrat. Dieses wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, da es in der benötigten Gesamtmenge äußerst kostenintensiv und schwer beschaffbar war. Alternativ wurde das subkutan verabreichbare Indo EDO Flüssigpräparat der Firma Chauvin-ankerpharm verwendet, das eine exakte Dosierung ermöglichte.

Die Verwendung einer Indomethazinemenge von 5 mg/kg KG pro Tag über einen Zeitraum von 2 Wochen führte bei insgesamt 42% der mit Indomethazin behandelten Tiere zum Tode (15 von 36). Die Sterblichkeit innerhalb der portalvenös ligierten Gruppe lag bei 52% vs. 27% in der Gruppe der Indomethazin behandelten, scheinoperierten Tiere. Bei allen vorzeitig verstorbenen Tieren wurde eine Obduktion durchgeführt, bei der Anzeichen für eine bakterielle Peritonitis verursacht durch Perforation des Gastrointestinaltraktes gefunden wurden. Daher wurde eine Dosis von 2,5 mg/kg KG verabreicht, bei der kein Tier vorzeitig an einer Peritonitis verstarb.

2.4 Einstellung einer akuten Hyperammonämie *in vivo*

Die Belastung von männlichen Wistar-Ratten (250-300g) mit Ammonium-Azetat (NH₄Ac) erfolgte durch intraperitoneale Injektion einer einzelnen Dosis in einer Konzentration von 4,5mmol/kg Körpergewicht. Nach ca. 10-15 min. fielen die Tiere in ein transientes Koma (Bewusstseinsverlust und Bewegungslosigkeit, keine Reflexe auf akustische oder optische Reize) aus dem sie nach weiteren 15-30 min. wieder erwachten. Den Kontrollen wurde physiologische Kochsalzlösung appliziert. Nach 1h, 6h oder 24h wurden die Tiere mit Pentobarbital (50mg/kg, Nacoren) narkotisiert. Blutzellen wurden durch transkardiale Perfusion mit 20ml einer physiologischen Kochsalzlösung, die 10.000 IE/l Heparin (Liquemin N) enthielt, entfernt. Nachfolgend wurde mit 100ml einer physiologischen Kochsalzlösung, der 20% Sucrose als Gefrierschutz zugesetzt wurde, perfundiert. Für die Proteinextraktion wurden die Hirne rasch entnommen, parzelliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im anderen Experiment wurden die Gehirne mit Zamboni-Fixativ (Bidmon *et al.* 2001) perfundiert und nachträglich erneut in Zamboni-Fixativ für 24h bei 4°C unter konstantem Schütteln fixiert.

2.5 Verabreichung von LPS *in vivo*

Für die akute *in vivo* LPS-Reizung wurde männlichen Wistar-Ratten (200-250g) LPS intraperitoneal in einer Konzentration von 4mg/kg Körpergewicht in 0.9% Kochsalzlösung injiziert. Nach Perfusion wie bei der Einstellung einer akuten Hyperammonämie wurde die Milz entnommen und für Western-Blot Analysen aufgearbeitet (s. u.).

2.6 Operationstechnik und Probengewinnung

Operiert wurde unter strikt aseptischen Bedingungen. Die Tiere wurden mittels eines Narkosegerätes („Sulla 808V“, Dräger, Lübeck, Deutschland) anästhesiert und beatmet, welches einen kontinuierlichen Fluss von Isofluran/O₂ (2%/98%) gewährleistet, der über eine Masken-Absaug-Vorrichtung für Nagetiere (Völker, Kaltenkirchen, Deutschland) appliziert wurde. Das Abdomen wurde über eine Mittellinieninzision eröffnet und anschließend wurden 125 IE Heparin (Liquemin N) intraperitoneal injiziert. Danach wurde nach Dislokation des Magen-Darm-Traktes nach extrakorporal die Pfortader isoliert. In der scheinoperierten Tierversuchsgruppe wurde diese dann vorübergehend für 60 Sekunden abgeklemmt. Für die Pfortaderligatur wurde ein steriler 2-0 Seidenfaden um die Pfortader gelegt und mit einem parallel zum Gefäß platzierten 20G-Mandrin (B. Braun, Melsungen, Deutschland) dazwischen verknotet. Anschließend wurde der Mandrin vorsichtig entfernt und somit eine definierte Pfortaderstenose etabliert. Zur postoperativen Analgesie wurde nun Carprofen (1mg/kg KG, Rimadyl) intraperitoneal appliziert und anschließend das Abdomen nach Re-Lokation der Eingeweide mittels einer getrennten Peritoneum/Muskulatur- sowie Hautnaht (2-0 Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. 16 Tage nach der Operation wurden die Ratten mit Pentobarbital (50 mg/kg KG, Nacoren) betäubt und transkardial mit 100 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), welche zusätzlich Heparin (10.000 IE/l, Liquemin N) enthielt, perfundiert, um jegliche Blutbestandteile zu eliminieren. Leber und Milz wurden entnommen und gewogen. Das Gehirn wurde entnommen und von einer Hemisphäre der Hirnkortex abpräpariert und für weitere Protein- und RNA-Analysen asserviert. Die andere Hemisphäre wurde für die Immunhistochemie weiterprozessiert.

2.7 Erfassung der lokomotorischen Aktivität

Zwei Wochen nach operativer Behandlung wurden die Tiere in computerkontrollierte Käfige (Typ 4) überführt, die mit einem Lichtschrankensystem ausgestattet waren (Actimot-System, TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland). Nach einer Adaptationsphase an die neue Umgebung wurden für 24h Messdaten erfasst.

2.8 Bestimmung des Blutammoniakspiegels

Der Blutammoniakspiegel wurde innerhalb von 3 Minuten in Blutproben aus dem rechten Herzventrikel bestimmt. Hierzu wurde der Ammonia Checker II (Daiichi Kagaku Co. Ltd., Kyoto, Japan, vertrieben durch die Nobis Labordiagnostica GmbH, Endingen, Deutschland) verwendet. Der Funktionszustand des Ammonia Checkers wurde mittels Ammonia Checker II Teststreifen (ARKRAY Europe BV, Amstelveen, Niederlande, vertrieben durch die A. Menarini Diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland) und die Ammonia Checker Kontrolllösung (Hitado Diagnostic System, Möhnese, Deutschland) überprüft.

2.9 Western-Blot Analyse

Das Gewebe wurde gelöst und mittels Stabhomogenisator (Ultra-Turrax) bei 4°C unter Benutzung von 10mmol/l Tris-HCl Puffer (pH 7,4) aufgeschlossen. Der Puffer setzte sich aus 1% Triton X-100, 140mmol/l NaCl, 1mmol/l EDTA, 1mmol/l EGTA, 10mmol/l NaF, 10mmol/l Na-Pyrophosphat, 1mmol/l Natrium-Vanadat, 20mmol/l β -Glycerophosphat und Proteaseinhibitor zusammen. Die homogenisierten Lysate wurden für 20 min. bei 20.000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Analysen verwendet. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des BioRad Protein-Assays ermittelt, nachdem die Proteinlysate so verdünnt wurden, dass die Messung der Proteinexpression im linearen Bereich der Bradford-Reaktion erfolgen konnte. Für die SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot Analyse wurden jeweils gleiche Mengen an Protein der einzelnen Proben (zwischen 80-100 μ g) verwendet. Vor Verwendung wurden die Proteinproben mit gleichem Volumen an 2x SDS-Auftragspuffer (Tris/HCl pH 6,8, 220mmol/l; EDTA

22,5mmol/l; SDS 9%; Glycerin 40%; Bromphenolblau 0,125 %; DTT 200mmol/l) versetzt und 5 min. bei 95°C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelen mit Trenngelen unterschiedlicher PAA-Konzentrationen (7,5-12%). Dabei kamen Elektrophoresesysteme unterschiedlicher Hersteller zum Einsatz (Sigma, Taufkirchen, Deutschland; Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland; Eigenanfertigung). Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 160 V, das Auftrennen der Proteine bei 200-240 V. Die Elektrophorese dauerte zwischen 2-6h. Als Proteinstandard wurde der Precision Plus Protein Standard (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Gele in Transferpuffer (39mmol/l Glyzin, 48mmol/l Tris/HCl, 0.03% SDS, 20% Methanol) äquilibriert und anschließend nach dem Semidryblotting Prinzip in einer Elektrobloiting-Kammer (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) auf Nitrozellulose-Membran (Schleicher-Schuell, Dassel, Deutschland) geblottet. Dabei wurden jeweils mindestens drei Lagen Whatman-Papier (Schleicher-Schuell, Dassel, Deutschland) auf den Graphitelektroden oberhalb und unterhalb des Gels angebracht und dazwischen das Gel auf der Nitrozellulose positioniert. Das Blottingverfahren wurde für 2h bei mind. 0,8mA/cm² Gelfläche in mit Blottingpuffer angefeuchteten Whatman-Papier und Nitrozellulose durchgeführt. Für die Immundetektion wurde die Membran mit 5% BSA in TBS-T (Tris 20mmol/l, pH 7,5, NaCl 150mmol/l, Tween-20, 0,1%) für mindestens 1h abgesättigt. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:1.000-1:5.000 in 5% BSA für 2h bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran unter den gleichen Bedingungen mit einem HRPOD gekoppeltem Zweitantikörper in einer Verdünnung zwischen 1:10.000 in TBS-T inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Zweitantikörpers durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T erfolgte die Detektion der Immunkomplexe mit Hilfe von Western-LightningTM Chemilumineszenz Reagens Plus auf der Kodak Image Station 4000MM.

2.10 Northwestern-Blot Analyse

Die Gesamt-RNA aus den Gewebeproben des zerebralen Kortex wurde unter Verwendung des RNeasy mini Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die aufgereinigte RNA wurde mit dem Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit und einem Spektrofleurimeter (Ascent FL, Thermo Electron Cooperation, Vantaa, Finnland) flourimetrisch quantifiziert.

Die RNA Oxidation wurde mittels Northwestern-Blot weitergehend analysiert. Dazu wurden formaldehydhaltige (2%) Agarosegele (0,8%) mit 5µg der isolierten RNA beladen. Nach der Elektrophorese wurde die RNA per kapillärem Transfer über Nacht auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Deutschland) übertragen. Dazu wurde das Gel für 15 min. in frisch zubereitetem 50mmol/l NaOH getränkt, anschließend für 5 min. in DEPC-behandeltem Wasser gewaschen, bevor es dann für 45 min. in Übertragungspuffer 20xSSC (3mol/l NaCl, 0,3mol/l Natriumcitrat, pH 7,0) inkubiert wurde. Nach abgeschlossenem Transfer wurde die Membran für eine Stunde bei 70°C erhitzt. Zur Detektion von 8-OH(d)G wurde die Membran zunächst in 5% Rinderserumalbumin (BSA), welches in 20mol/l Tris-HCL pH 7,5 (enthält 150mmol/l NaCl und 0,1% Tween 20) gelöst wurde, geblockt und dann für 2h mit dem Anti-8OH(d)G-Antikörper (1:5.000) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschung und erneuter Inkubation mit meerrettichperoxidasegebundenem Anti-Maus-Immunglobulin G Antikörper in 1:10.000 Verdünnung für 2h bei Raumtemperatur, wurde der Blot erneut gewaschen und mittels Western-Lightning™ Chemiluminesenz Reagens Plus entwickelt.

2.11 Densitometrische Auswertung

Die digitale Bilderfassung und densitometrische Analyse wurde mit der Kodak Image Station 4000MM und der Kodak MI Software (v.4.0.3) durchgeführt. Die Expression der Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Beladungskontrolle und zur Normierung der Werte verwendet.

2.12 Immunhistochemie

Die Hellfeld-Mikroskopie wurde mit dem Cell Observer-Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Mit Zambonifixativ behandelte Hirne (Bidmon *et al.* 2001; 4% Paraformaldehyd und 15% Picrinsäure in Phosphatpuffer (pH 7,4).) wurden zunächst in 20% Saccharose in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, 24h, 4°C) eingelegt und anschließend nach Einfrieren auf Trockeneis mit einem Kryotom auf 50µm Dicke geschnitten. Die Kryoschnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und endogene

Peroxidasen durch Inkubation der Schnitte mit 3% H₂O₂ in PBS für 20 min. blockiert. Die frei flottierenden 50µm dicken Schnitte wurden viermal mit PBS gespült, mit 0,1% Triton X-100 und 10% Ziegen Serum in PBS für 1h geblockt und dann mit dem polyklonalen Anti-Iba-1-Antikörper (48h bei 4°C in Verdünnung 1:200) für 48h bei 4°C inkubiert oder *Wisteria floribunda*-HPRT gekoppelt. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden die Schnitte daraufhin mit dem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert (48h bei 4°C), danach erneut viermal mit PBS gewaschen, anschließend in Chromalaun-Gelatine getaucht, auf Objektträger aufgezogen und mittels Fluoromount-G stabilisiert. Sämtliche Antikörperinkubationen erfolgten in Gegenwart von 10% Ziegen Serum. Alle Waschschritte wurden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln durchgeführt.

2.13 Analyse der Zytokin-mRNA-Expression durch quantitative reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR)

Gesamt-RNA wurde mit einem kommerziellen RNA-Extraktionskit (RNeasy Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die cDNA wurde mit dem QuantiTect reverse Transkription Kit gewonnen. Die Genexpressionslevel wurden mittels Real-Time-SYBR-Green-PCR mit dem 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Görg *et al.* 2006) gemessen. Die Daten wurden in Duplikaten für jedes Gen erhoben. Die Mittelwerte der Ct-Werte des Zielgens wurden vom Mittelwert der Ct-Werte des Housekeeping-Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (*hpert1*) für die jeweilige Probe subtrahiert. Die nachfolgenden Real-Time-Primer wurden verwendet:

rat TNF-a-for, 5'-tgatcgggtcccaacaaggag-3'; rat TNF-a-rev, 5'-tgatgagaggaggccattt-3';
rat Il-1b-for, 5'-agacagctgcactgcaggct-3'; rat Il-1b-rev, 5'-cagcacgaggcattttgtt-3';
rat Il-6-for, 5'-agactccagccagttgct-3'; rat Il-6-rev, 5'-ggcagtggtgtcaacaaca-3';
rat *hpert1*-for, 5'-tgctcgagatgtcatgaagga-3'; rat *hpert1*-rev, 5'-cagagggccacaatgtgatg-3'.

2.14 Auswertung der Ergebnisse

Die Datenverarbeitung und statistische Analyse wurde mit Excel (Microsoft) und Prism4 für Windows (Graph-Pad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben. Die beschriebenen Statistiken wurden mittels One- oder Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) erstellt gefolgt von Tukey's oder Bonferroni *post hoc* Testung. Zur Beurteilung der statistischen Bedeutsamkeit wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf Blutammoniakkonzentration, Körperwachstum, sowie Leber- und Milzgewicht

Um den Einfluss einer portalvenösen Ligatur (PVL) auf allgemeine Wachstumsparameter, den Blutammoniakspiegel und unmittelbar dem portalvenösen System angeschlossene Organe zu testen, wurden die periphere Blutammoniakkonzentration, die absolute Körpergewichtszunahme nebst täglicher Futter- und Wasseraufnahme, sowie das relative Leber- und Milzgewicht von männlichen Wistar-Ratten gemessen. Wie in Tabelle 2 dargestellt erhöht die Anlage einer portalvenösen Ligatur nach 2 Wochen die Blutammoniakkonzentration im peripheren Blut signifikant. Im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen (Sham) zeigten die PVL-Ratten eine signifikant verminderte Körpergewichtszunahme am Ende des Beobachtungszeitraum (Tabelle 2). Die PVL-Tiere zeigten gegenüber den scheinoperierten Tieren ein deutlich vermindertes relatives, auf das jeweilige Körpergewicht bezogenes, Lebergewicht sowie ein erhöhtes relatives Milzgewicht. (Tabelle 2). Mit Ausnahme des Parameters „relatives Lebergewicht“ war kein anderer Parameter bei von PVL-Ratten verglichen mit scheinoperierten Ratten in den unbehandelten und den indomethazinbehandelten Versuchsgruppen verändert.

Tabelle 2. Effekt einer portalvenösen Ligatur und Indomethazinbehandlung auf den peripheren Blutammoniakspiegel, die Körpergewichtszunahme, das relative Leber- und das relative Milzgewicht. Scheinoperierte (Sham) und portalvenös ligierte (PVL) Ratten wurden zwei Wochen nach der Operation getötet und die Parameter Körpergewichtszunahme innerhalb von zwei Wochen, Leber- und Milzgewicht sowie der Blutammoniakspiegel durch Abwiegen bzw. Konzentrationsmessung bestimmt. Zwei Gruppen wurden täglich mit Indomethazin behandelt (Indo, 2,5 mg/kg KG).

*Statistisch signifikant gegenüber den scheinoperierten Kontrollen.

#Statistisch signifikant gegenüber indomethazinbehandelten, scheinoperierten Kontrollen.

	Ammoniakspiegel im Blut ($\mu\text{mol/l}$)	Körpergewichts- zunahme (g)	Lebergewicht (% des Körpergewichts)	Milzgewicht (% des Körpergewichts)
Sham	$30,9 \pm 5,2$	$81,8 \pm 2,6$	$4,3 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,01$
PVL	$147,7 \pm 19,6$ *	$38,5 \pm 4,0$ *	$3,5 \pm 0,2$ *	$0,46 \pm 0,02$ *
Sham + Indo	$10,9 \pm 2,3$	$84,7 \pm 4,4$	$4,0 \pm 3,7$	$0,25 \pm 0,01$
PVL + Indo	$142,4 \pm 26,5$ #	$44,6 \pm 5,6$ #	$3,7 \pm 0,1$	$0,51 \pm 0,05$ #

Die Anlage einer PVL hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere (Tabelle 3).

Tabelle 3. Effekt einer portalvenösen Ligatur auf Futter- und Wasseraufnahme von Wistar-Ratten. Scheinoperierte (Sham) und portalvenös ligierte (PVL) Ratten wurden zwei Wochen nach der Operation getötet. Zwei Gruppen wurden täglich mit Indomethazin behandelt (Indo, 2,5 mg/kg KG). Die Parameter Futter- und Wasseraufnahme wurden durch Abwiegen bestimmt und repräsentieren Mittelwerte der täglichen Futter- und Wasseraufnahme während eines Beobachtungszeitraumes von zwei Wochen.
n.s.: statistisch nicht signifikant gegenüber scheineroperierten Kontrollen.

	Futteraufnahme (g)	Wasseraufnahme (ml)
Sham	46,4 ± 1,5	68,9 ± 4,0
PVL	38,2 ± 3,6 ^{n.s.}	72,0 ± 8,3 ^{n.s.}
Sham + Indo	44,6 ± 1,0	73,1 ± 2,9
PVL + Indo	38,6 ± 2,4 ^{n.s.}	79,7 ± 4,3 ^{n.s.}

3.2 Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf die Expression von mit oxidativem Stress assoziierten Proteinen und der Oxidation von RNA

Wie in Abb. 5A und C in Western-Blot Analysen erkennbar ist, zeigen PVL-Ratten einen signifikanten Anstieg der Nitrierung spezifischer zerebrokortikaler Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15-75 kDa um das 1,4fache. Im Gegensatz dazu ließ sich kein signifikanter Anstieg der PTN bei indomethazinbehandelten PVL-Ratten im Vergleich zu scheineroperierten Kontrollen oder indomethazinbehandelten, scheineroperierten Kontrollen (Sham) beobachten (Abb. 5B und C).

In Northwestern-Blot Analysen zeigte sich, dass der Level oxidierter RNA im zerebralen Kortex von PVL-Ratten gegenüber dem von scheineroperierten Kontrollen signifikant erhöht war (Abb. 6A und C). Die Verabreichung von Indomethazin übte keinen Einfluss auf die zerebrokortikale RNA-Oxidation bei den scheineroperierten Kontrollen aus, verhinderte jedoch den Anstieg in PVL-Ratten (Abb. 6B und C).

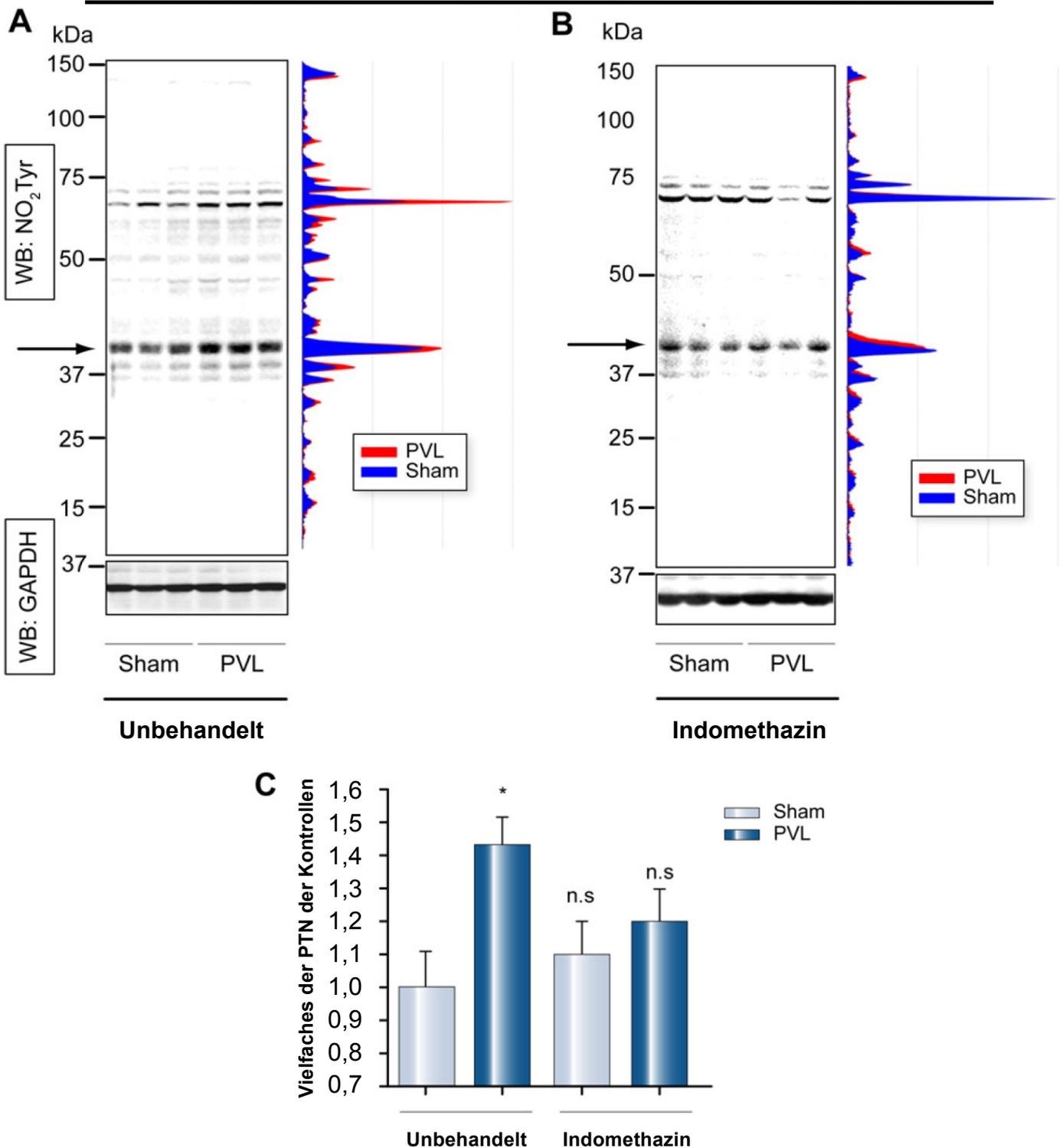


Abb. 5. Protein Tyrosin Nitrierung im zerebralen Kortex scheinoperierter und portalvenös ligierter Ratten. Wistar-Ratten wurden entweder scheinoperiert (Sham) oder portalvenös ligiert (PVL). Zwei Gruppen wurden täglich mit Indomethazin behandelt (Indo, 2,5 mg/kg KG). (A und B) Western-Blot Analyse von tyrosinnitrierten Proteinen in Proteinhomogenaten, die aus dem zerebralen Kortex aufgearbeitet wurden. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Die Intensität der Anti-NO₂Tyr-Immunreaktivität ist zusätzlich als Profilplot gezeigt. Die Pfeile zeigen die Bande an, welche zur densitometrischen Quantifizierung verwendet wurde. (C) Statistische Analyse der Protein-Tyrosin-Nitrierung (PTN) bei schein- und PVL-operierten Ratten. Die Anti-Nitrotyrosin-Immunreaktivität wurde normiert auf die Kontrollgruppe densitometrisch quantifiziert. Die Nitrierung bei den scheinoperierten Kontrollen wurde auf Eins gesetzt und die Expressionslevel, die in den anderen Versuchsgruppen gefunden wurden, sind als ein Vielfaches davon angegeben. Die Daten basieren auf Untersuchungen von 7-14 Tieren. *Der Unterschied ist statistisch signifikant gegenüber scheinoperierten Kontrollen. n.s.: Kein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber scheinoperierten Kontrollen. Abb. aus Brück *et al.* 2011.

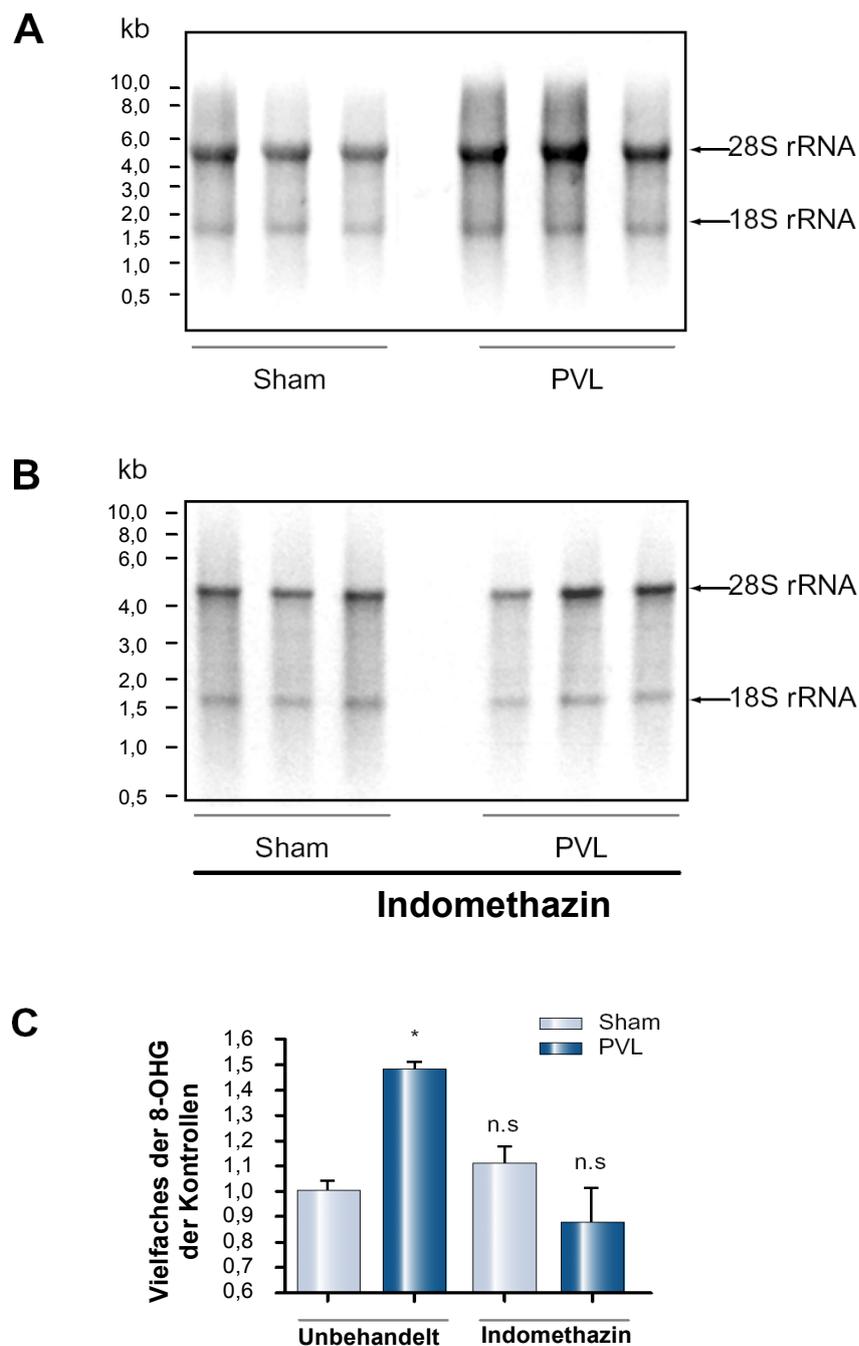


Abb. 6. RNA-Oxidation im zerebralen Kortex scheinoperierter und portalvenös ligierter Ratten. Wistar-Ratten wurden entweder scheinoperiert (Sham) oder portalvenös ligiert (PVL). Zwei Gruppen wurden täglich mit Indomethazin behandelt (Indo, 2,5 mg/kg KG). (A und B) Detektion von 8-OHG mittels Northwestern-Blot Analyse aus RNA, die aus zerebralem Kortex isoliert wurde. (C) Statistische Analyse der RNA-Oxidation bei scheinoperierten und portalvenös ligierten Ratten. Die Anti-8-OHG-Immunreaktivität wurde densitometrisch quantifiziert. Die RNA-Oxidation bei den scheinoperierten Kontrollen wurde auf Eins gesetzt und die Expressionslevel, die in den anderen Versuchsgruppen gefunden wurden, sind als ein Vielfaches davon angegeben. Die Daten basieren auf Untersuchungen von 3-4 Tieren pro Versuchsgruppe.

*Der Unterschied ist statistisch signifikant gegenüber scheinoperierten Kontrollen. n.s.: Kein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber scheinoperierten Kontrollen. Abb. aus Brück *et al.* 2011.

Die Proteinexpressionslevel der induzierbaren oder neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS, nNOS) wurden durch Anlage einer PVL nicht verändert. (Abb. 7A).

Auch die Expression der für die Glutathomöostase wichtigen Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 wurden durch die PVL nicht beeinflusst. Wie in Abb. 7B gezeigt hatte die PVL keinen Einfluss auf die Proteinexpressionslevel des glialen Glutamattransporters (Glt-1/EAAT2) und des Glutamat-Aspartat-Cotransporters (GLAST/EAAT1) im zerebralen Kortex verglichen mit scheinoperierten Kontrollen.

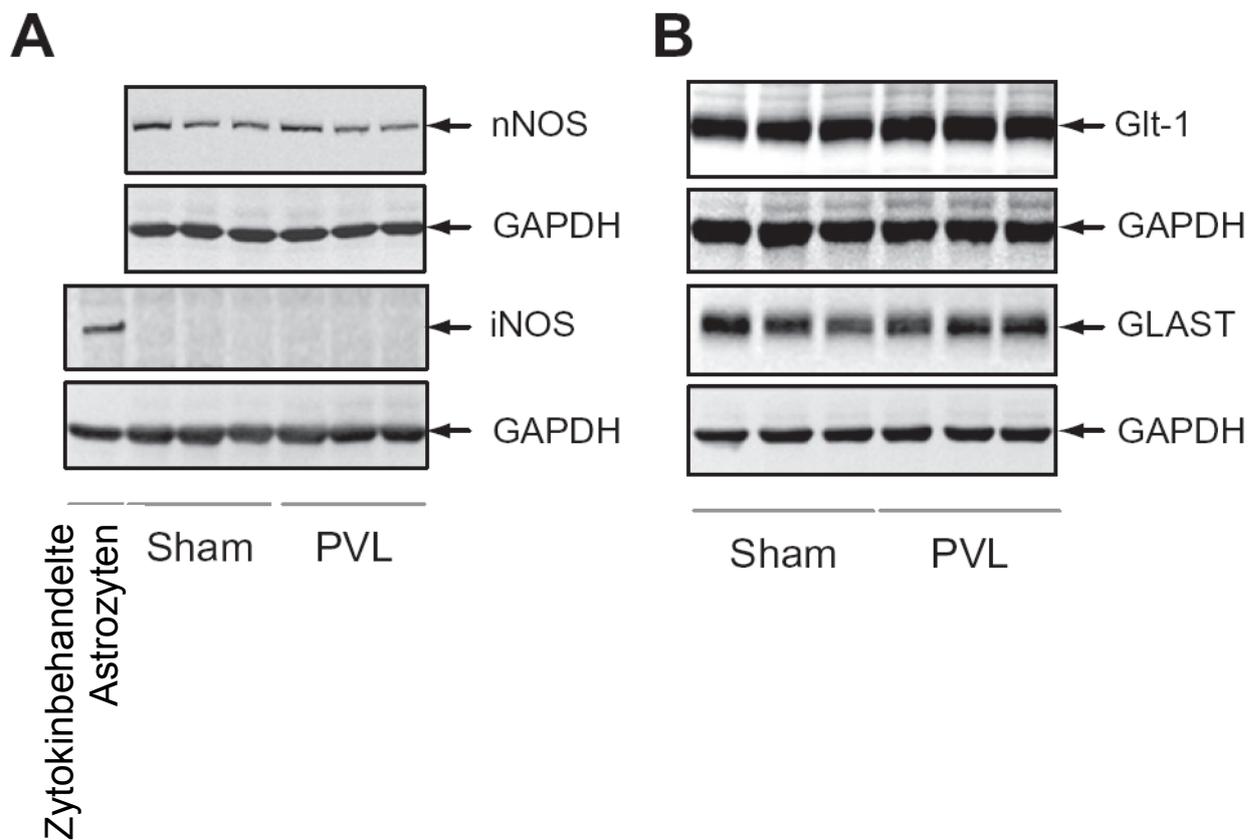


Abb. 7. Glutamattransporter- und Stickstoffmonoxid-Synthase-Isoformen-Expression im zerebralen Kortex von scheinoperierten und PVL-Ratten. Wistar-Ratten wurden entweder scheinoperiert (Sham) oder portalvenös ligiert (PVL). Aus dem zerebralen Kortex gewonnene Proteinextrakte wurden mittels Western-Blot analysiert auf (A) Expression der neuronalen (nNOS) und induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), sowie (B) den glialen Glutamattransporter 1 (Glt-1) und Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST). Die GAPDH diente als Beladungskontrolle. Zytokinbehandelte [TNF- α (10 ng/ml) + IFN- γ (100 U/ml) + IL-1 β (100 U/ml) + LPS (1 ng/ml), 24h], kultivierte Rattenastrozyten dienten als Positivkontrolle für die Detektion der iNOS. Die Daten basieren auf Untersuchungen an 6-11 Versuchstieren pro Gruppe. Abb. aus Brück *et al.* 2011.

3.3 Effekt einer portalvenösen Ligatur auf die mRNA-Expression *pro*-inflammatorischer Zytokine im zerebralen Rattenkortex

Die Expression *pro*-inflammatorischer Zytokine wurde exemplarisch durch Real-Time-PCR Analyse von Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) bei scheinoperierten und PVL-Ratten analysiert. Wie in Abb. 8 gezeigt unterscheiden sich die IL-1 β - und TNF- α -mRNA-Expressionsniveaus im zerebralen Kortex scheinoperierter Ratten nicht signifikant von Ratten nach portalvenöser Ligatur. Im Gegensatz dazu war der mRNA-Level von IL-6 im Kortex von PVL-Ratten signifikant gegenüber den scheinoperierten Ratten erhöht. Die chronische Gabe von Indomethazin konnte den PVL-induzierten Anstieg der IL-6 mRNA vollständig verhindern.

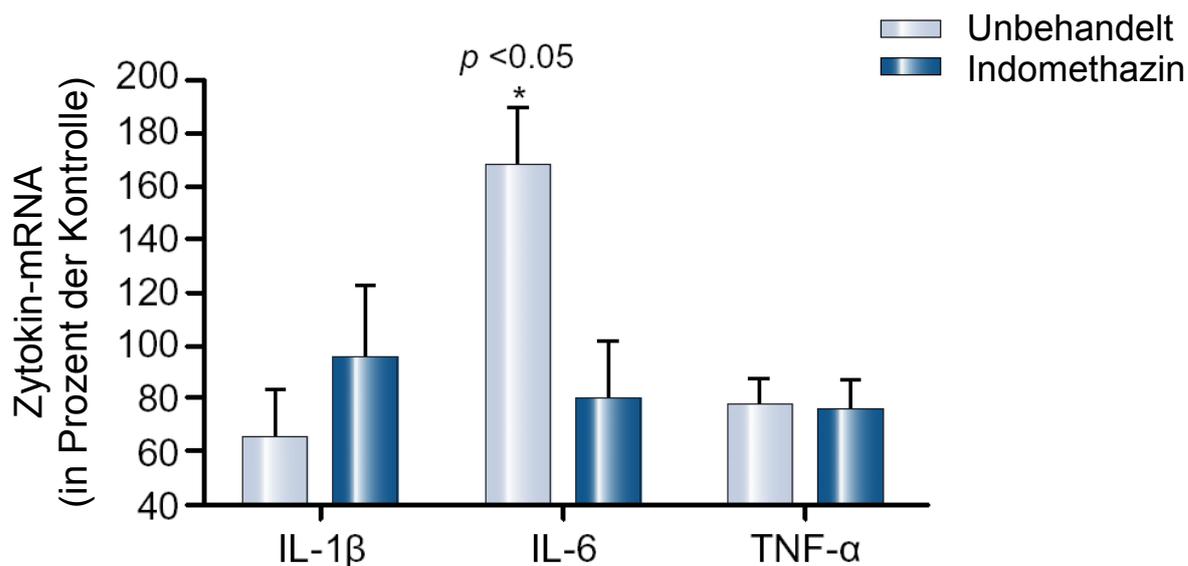


Abb. 8. Effekt einer portalvenösen Ligatur auf Zytokin-mRNA-Expressionsniveaus im zerebralen Kortex. Unbehandelte und indomethazinbehandelte, schein- oder PVL-operierte Ratten wurden zwei Wochen nach Operation geopfert. RNA-Präparationen aus dem zerebralen Kortex wurden zur Quantifizierung der mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α mittels Real-Time-PCR verwendet. Relative Veränderungen der mRNA-Expression bei PVL-operierten Ratten sind in Prozent bezogen auf die scheinoperierten Kontrollen angegeben. Die Daten basieren auf vier Versuchstieren pro Gruppe.

*Statistisch signifikant erhöht gegenüber scheinoperierten Kontrollen. Abb. aus Brück *et al.* 2011.

3.4 Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf den Aktivierungszustand von Mikroglia

Mikroglia ist eine wichtige Quelle für die Produktion *pro*-inflammatorischer Zytokine im zentralen Nervensystem. Eine Aktivierung der Mikroglia tritt in Rattenhirnen nach akutem Leberversagen [Jiang *et al.* 2009] und wie in Abb. 9A gezeigt auch nach akuter Ammoniak-Intoxikation auf. Die Hochregulation von α -D-Galaktosyl-Residuen, wie sie mit Isolektion B-4 (IB-4) detektiert werden kann, sowie eine vermehrte Expression des ionisierten calciumbindenden Adaptermoleküls 1 (Iba-1) repräsentieren Marker für eine Mikrogliaaktivierung. [Marty *et al.* 1991, Ito *et al.* 1998]. Durch Anfärbung von Hirnschnitten schein- oder PVL-operierter Tiere mit Isolektion-B4 oder Iba-1 konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden (Abb. 9B). Im Gegensatz dazu zeigen akut mit NH₄Azetat-belastete Ratten eine erhöhte Isolektion B-4 Immunoreaktivität (Abb. 9A). Auch die „verästelte“ mikrogliale Morphologie, wie sie charakteristisch für den Phänotyp ruhender Mikroglia ist, ist bei PVL-Ratten erhalten (Abb. 9C). Nach Aktivierung von Mikroglia kann eine Desintegration der perineuralen Netz-Matrix (PNM) erfolgen. Die PNM exprimiert N-Azetyl-D-Galaktosamin-verknüpfte Proteine, welche mittels *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) visualisiert werden [Bertolotto *et al.* 1996, Bidmon *et al.* 1998]. Die Untersuchung der Matrixintegrität an der Schnittstelle des motorischen und somatosensorischen Kortex mittels WFA-Färbung, die verstärkt zu erwarten ist bei motorischen Störungen, die durch inflammatorische Reaktionen hervorgerufen werden, zeigte keinen Unterschied zwischen den PVL- und scheinoperierten Ratten (Abb. 9D). Die Western-Blot Analyse der Mikrogliaaktivierungsmarker CD68 und MHC-II [Lemstra *et al.* 2007] zeigt eine unveränderte Expression zwei Wochen nach Anlage einer PVL (Abb. 9E und F). Diese Daten belegen, dass eine portalvenöse Ligatur nicht mit einer Aktivierung von Mikroglia assoziiert ist.

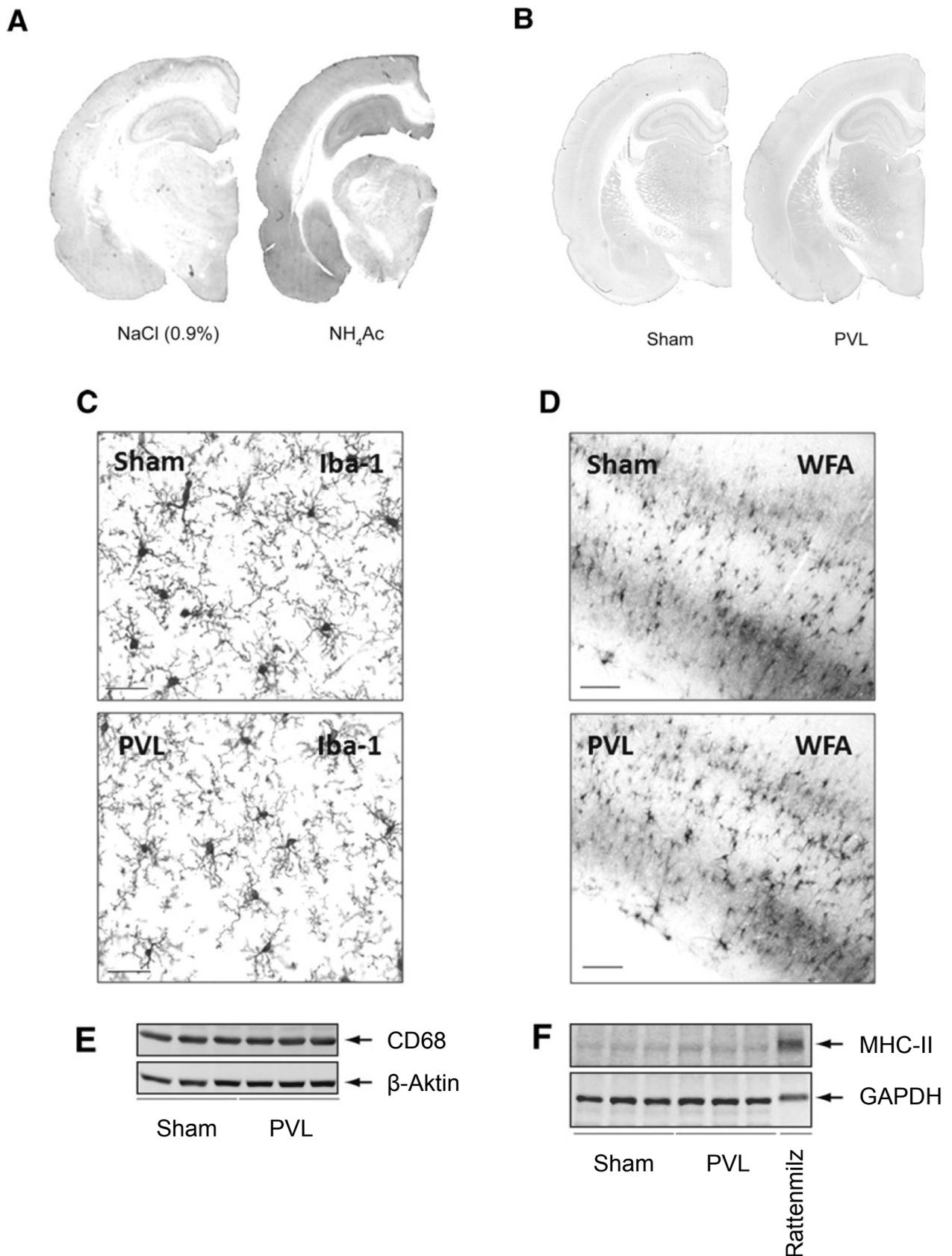


Abb. 9. Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf Mikrogliaaktivierungsmarker. Wistar-Ratten wurden entweder scheinoperiert (Sham) oder portalvenöse ligiert (PVL). In einer separaten Versuchsreihe wurde Ratten entweder NaCl (0,9%) oder Ammonium-Azetat (NH₄Ac, 4,5 mmol/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert und die Tiere 3h später geopfert. (A und B) Immunhistochemische Detektion einer Mikrogliaaktivierung durch Isolektin B-4-Färbung nach (A) akuter Ammoniak-Intoxikation oder (B) portalvenöser Ligatur. (C) Illustration der mikroglialen Morphologie durch immunhistochemische Detektion von Iba-1 an der Schnittstelle Motorkortex/somatosensorischer Kortex. (Maßstab-Balken: 50 µm) (D) Färbung der perineuronalen Matrix mit *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) Immunhistochemie. Die Bilder wurden an der Schnittstelle Motorkortex/somatosensorischer Kortex gemacht. (Maßstab-Balken: 200 µm) (E und F) Western-Blot Analyse der Mikrogliaaktivierungsmarker CD68 und MHC-II. Proteinextrakte der Milz einer mit Lipopolysaccharid behandelten Ratte (24h, 4 mg/kg Körpergewicht) wurden als Positivkontrolle für die Detektion von MHC-II verwendet. Die GAPDH oder β-Aktin dienten als Beladungskontrolle. Abb. aus Brück *et al.* 2011.

3.5 Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf die lokomotorische Aktivität der Ratte und Wirkung von Indomethazin

Der lokomotorischen Aktivität liegt neuronale Aktivität und Plastizität zugrunde, welche bei neurologischen Störungen, wie z. B. bei Ischämie, Parkinson und der hepatischen Enzephalopathie beeinträchtigt ist [Butterworth *et al.* 2009, Shen *et al.* 2010, Pisani *et al.* 2005]. Um Verhaltenseffekte einer portalvenösen Ligatur zu bestimmen wurde die lokomotorische Aktivität durch ein computergestütztes System mit Lichtschranken-erfassung in einem Käfig aufgezeichnet. Abb. 10A zeigt die bekannte zirkadiane Periodizität einer shamoperierten Ratte in ihrem Käfig während eines vierundzwanzigstündigen Zeitraumes mit vermehrter nächtlicher Aktivität gegenüber dem Tagesintervall. Diese Rhythmik bleibt nach portalvenöser Ligatur erhalten (Abb. 10B), jedoch mit signifikant verminderter Amplitude der nächtlichen Laufaktivität der PVL-operierten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 10A und C). Ein Unterschied ist bei den PVL-Tieren auch beim Aufrichtungsverhalten (Rearing) in der Nachtphase (Abb. 10D und E) zu beobachten. Die Anzahl der Rearings blieb unverändert, jedoch war deren Dauer bei den PVL-Ratten signifikant kürzer als bei den scheinoperierten Kontrollen. Die chronische Intervention mit Indomethazin (täglich 2,5 mg/kg KG s.c.) bewirkte die Aufhebung der Unterschiede zwischen den PVL-Ratten und den scheinoperierten Kontrollen in Bezug auf deren lokomotorische Aktivität und die Dauer des Aufrichtungsverhaltens (Abb. 10B und E). Eine Tendenz zu verminderter lokomotorischer Aktivität der indomethazinbehandelten scheinoperierten Ratten erreichte keine statistische Signifikanz (Abb. 10C und E).

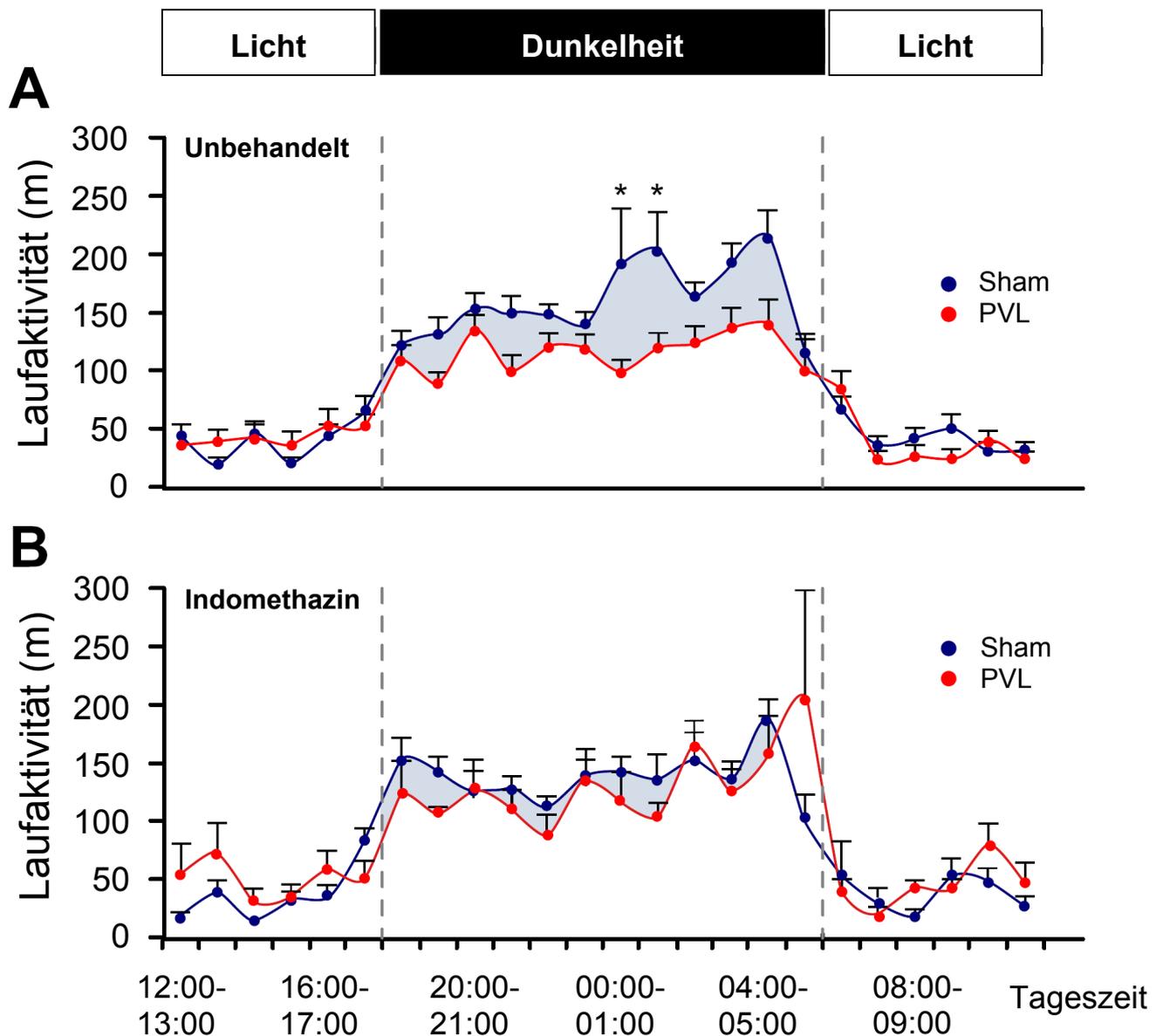


Abb. 10A/B. Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf die zirkadiane lokomotorische Aktivität. Wistar-Ratten wurden entweder scheinoperiert (Sham) oder portalvenös ligiert (PVL). Zwei Gruppen wurden täglich mit Indomethazin behandelt (Indo, 2,5 mg/kg KG). Zwei Wochen nach der Operation wurden die Tiere von einem computergestützten System überwacht (siehe Methodenteil). Gezeigt ist die Laufaktivität nach Scheinoperation oder portalvenöser Ligatur von (A) unbehandelten sowie (B) indomethazinbehandelten Ratten. Die Laufaktivität ist dargestellt als zurückgelegte Distanz in m/h während einer vierundzwanzigstündigen Observationsperiode. Die Fläche zwischen beiden Kurven in Zeiträumen mit niedrigerer nächtlicher Laufaktivität bei den PVL-Ratten ist grau schraffiert. Die Daten basieren auf Untersuchungen an 7-15 Versuchstieren pro Gruppe.

*Statistisch signifikant gegenüber scheinoperierten Kontrollen bei Auswertung mittels Two-way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Testung. Abb. aus Brück *et al.* 2011.

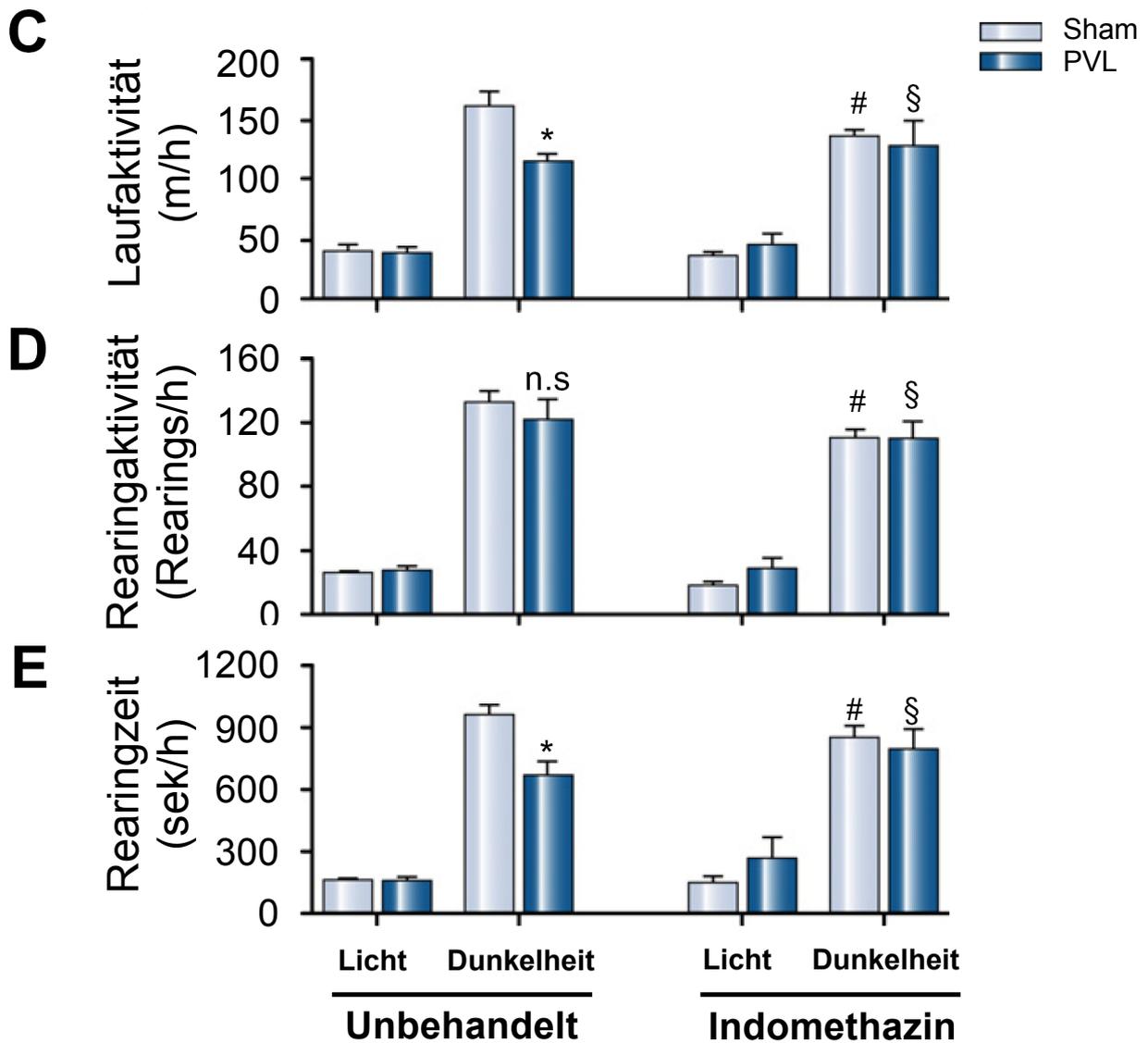


Abb. 10C-E. Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf lokomotorische Aktivität in Wistar-Ratten. Statistischer Vergleich von zurückgelegter Laufstrecke und dem Aufrichtungsverhalten (Rearing) (Frequenz und Dauer) während Hell- und Dunkelphasen von scheinoperierten (Sham) und portalvenös ligierten (PVL) Ratten zwei Wochen nach Operation. Die Daten basieren auf 7-15 Versuchstieren pro Gruppe.

*Statistisch signifikanter Unterschied der nächtlichen lokomotorischen Aktivität gegenüber scheinoperierten Kontrollen (One-way ANOVA gefolgt von Tukey's Multiple Comparison *post hoc* Testung).

#Kein signifikanter Unterschied zur nächtlichen Aktivität von scheinoperierten, unbehandelten Ratten.

§Kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur nächtlichen Aktivität von scheinoperierten, indomethazinbehandelten Ratten. Die Laufaktivität während der Hellphasen war weder nach portalvenöser Ligatur verändert noch beim Vergleich der Aktivität von unbehandelten und indomethazinbehandelten Tiergruppen. Abb. aus Brück *et al.* 2011.

4. Diskussion

4.1 Oxidativer/nitrosativer Stress im Modell der portalvenösen Ligatur

Die hepatische Enzephalopathie ist ein im Zusammenhang mit Leberversagen unterschiedlicher Genese auftretendes neuropsychiatrisches Syndrom [Häussinger *et al.* 2007]. Pathogenetisch kommt es nach Leberversagen unter anderem zu einem Anstieg der Ammoniakkonzentration im systemischen Blutkreislauf, welche neurotoxisch wirken kann [Herold *et al.* 2007]. Zwischen Ammoniaktoxizität und der Induktion von oxidativem/nitrosativem Stress konnte ein auffälliger Zusammenhang in kultivierten Astrozyten und im Rattenhirn *in vivo* belegt werden [Häussinger *et al.* 2010, Schliess *et al.* 2002 u. 2004]. Funktionelle Konsequenzen dieser oxidativen/nitrosativen Stressantwort sind posttranslationale Proteinmodifikationen, die Oxidation von RNA, eine veränderte Signaltransduktion und Änderungen der Genexpression in Astrozyten [Schliess *et al.* 2002, Görg *et al.* 2008].

Es existieren unterschiedliche Tiermodelle, die für Untersuchungen der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie herangezogen werden. Die portocavale Anastomose (PCA) an Ratten ist ein häufig verwendetes Modell für die Erforschung der auf portosystemischem Shunting basierenden hepatischen Enzephalopathie (Typ B HE). Neben erhöhten Ammoniakspiegeln im Blut portocaval anastomosierter Tiere wurde oxidativer Stress im Gehirn nachgewiesen, welcher zu erhöhter Proteinoxidation und Protein-Tyrosin-Nitrierung führte [Suarez *et al.* 2006, Butterworth *et al.* 2009, Bjerring *et al.* 2011, Carbonero-Aguilar *et al.* 2011]. Das Experimentalmodell der portalvenösen Ligatur, welches auch der Typ B HE zugeordnet ist, wird von der ISHEN-Kommission empfohlen, um die klinischen Eigenschaften einer geringgradigen hepatischen Enzephalopathie (mHE) nachzuempfinden. Im Hinblick auf die für HE typischen neurologischen und zellbiologischen Veränderungen wurde es mehrfach charakterisiert [Butterworth *et al.* 2009, García-Moreno *et al.* 2005, Roselló *et al.* 2008]. Wie in der aktuellen Studie gezeigt, ist eine PVL in der Lage, oxidativen und nitrosativen Stress im Rattenhirn zu induzieren, was durch einen signifikanten Anstieg der zerebralen Protein-Tyrosin-Nitrierung und Oxidation von RNA belegt wird. Eine erhöhte Tyrosinnitrierung zerebrokortikaler und astrozytärer Proteine durch die Bildung von oxidativem Stress konnte auch in HE-Tierexperimentalmodellen und Ammoniak-behandelten kultivierten

Astrozyten gezeigt und deren Bedeutsamkeit für die Pathophysiologie belegt werden [Häussinger *et al.* 2005]. Erhöhte Level an tyrosinnitrierten Proteinen und oxidiertes RNA wurden einheitlich im zerebralen Kortex bei unterschiedlichen Tiermodellen zur HE nachgewiesen und ebenso in *postmortalen* kortikalen Hirngewebsbiopsien von Leberzirrhosepatienten, die mit einer hepatischen Enzephalopathie verstorben sind [Görg *et al.* 2008 u. 2010b].

Bei akut ammoniakbelasteten Ratten ist oxidiertes RNA in der Umgebung von Synapsen nachweisbar [Görg *et al.* 2008] und könnte für eine Störung der lokalen proteinsyntheseabhängigen synaptischen Plastizität, welche für Lern- und Gedächtnisvorgänge nötig ist, verantwortlich sein [Schuman *et al.* 2006, Görg *et al.* 2010b].

Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei Hyperammonämie und hepatischer Enzephalopathie oxidiertes RNA die neuronale Übertragung, welche Kognition und Verhalten zugrunde liegt, beeinträchtigt [Görg *et al.* 2008]. Diese Hypothese wird nun durch Erkenntnisse aus der vorliegenden Doktorarbeit gefestigt, die eine Assoziation von erhöhter RNA-Oxidation und gestörtem Laufverhalten zeigen. Die Behandlung von PVL-Ratten mit Indomethazin verhinderte nicht nur die durch PVL induzierte Protein-Tyrosin-Nitrierung und RNA-Oxidation im Hirn, sondern verbesserte auch die lokomotorische Aktivität der Ratten signifikant. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, bei der der Cyclooxygenasehemmstoff Ibuprofen die Lernfähigkeit und das lokomotorische Verhalten von portocaval anastomosierten Ratten wiederherstellen konnte [Cauli *et al.* 2007].

4.2 Neuroinflammation bei hepatischer Enzephalopathie

Kürzlich wurde Neuroinflammation mit der Pathogenese des akuten Leberversagens in Zusammenhang gebracht [Jiang *et al.* 2009]. Neuroinflammation ist durch die Aktivierung von Mikroglia charakterisiert, die wiederum eine Quelle potentiell neurotoxischer inflammatorischer Faktoren, wie z. B. $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-6$ und von iNOS gebildetem Stickstoffmonoxid darstellt [Dheen *et al.* 2007]. Die Freisetzung von Zytokinen wurde bei komatösen Ratten im akuten Leberversagen herbeigeführt durch hepatische Devaskularisation beschrieben [Jiang *et al.* 2009]. *Pro*-inflammatorische Zytokine, wie z. B. der Tumor-Nekrose-Faktor- α ($TNF-\alpha$), spielen eine Rolle bei neuroinflammatorischen Erkrankungen und sind im Blut von Patienten mit hepatischer

Enzephalopathie erhöht [Häussinger *et al.* 2007]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass sie oxidativen Stress in kultivierten Astrozyten induzieren [Görg *et al.* 2006].

Im Modell der portalvenös ligierten Ratte zeigt sich keine Mikrogliaaktivierung nach Anfärbung von Hirnschnitten mit Antikörpern gegen Iba-1 (Abb. 9C) oder mit Isolektin-B4 (Abb. 9B). Ebenso wurde keine Hochregulation der Mikrogliaaktivierungsmarker, CD68 und MHC-II, im Kortex der PVL-Ratten gefunden (Abb. 9E und F). Auch die Matrixintegrität an der Schnittstelle von Neuronen zur Glia im Bereich des motorischen und somatosensorischen Kortex war bei diesen Tieren erhalten (Abb. 9D). Es ist bekannt, dass aktivierte Mikroglia die kortikalen Funktionen mittels Entfernung präsynaptischer Axonendigungen („*synaptic stripping*“) in diesem Areal beeinträchtigen können und dies eine Beeinträchtigung motorischer Funktionen bedingt [Bidmon *et al.* 1998, Trapp *et al.* 2007]. Diese Entdeckungen legen nahe, dass Neuroinflammation keine bedeutsame Rolle im zerebralen Kortex von PVL-Ratten spielt, wenngleich auch ein Beitrag der Mikroglia zur prostanoïdvermittelten Störung der lokomotorischen Aktivität als Folge einer PVL nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass kultivierte Astrozyten im Gegensatz zu Mikroglia nach Stimulation mit Ammoniumchlorid mit einer erhöhten Prostanoidfreisetzung reagieren [Zemtsova *et al.* 2011]. Auch hier zeigt sich gegenüber anderen Leberschädigungstiermodellen, der hepatischen Devaskularisation, einer ammoniakangereicherten Diät oder der Gallengangsligatur, ein deutlicher Unterschied [Jiang *et al.* 2009, Rodrigo *et al.* 2010]. Die Befunde dieser Doktorarbeit stehen im Gegensatz zu Untersuchungen, die eine erhöhte Mikrogliaaktivierung in *postmortem* Hirnbiopsien von Leberzirrhosepatienten mit HE zeigen [Zemtsova *et al.* 2011]. Eine Erklärung hierfür ist, dass eine Mikrogliaaktivierung erst in sehr späten Stadien der chronischen Leberschädigung auftreten könnte. Durch Anlage einer PVL wird die Leberfunktion möglicherweise noch nicht in ausreichendem Umfang beeinträchtigt.

Die PVL hatte auch keinen Einfluss auf die zerebrale mRNA-Expression von Il-1 β oder TNF- α (Abb. 8). Es kam jedoch zu einem Anstieg der Il-6-mRNA, welche durch Indomethazingabe verhindert werden konnte (Abb. 8). Die physiologische Rolle von Il-6 im Gehirn ist bislang unbekannt und als Synthesort im Gehirn kommen neben Mikroglia auch andere Zelltypen wie Astrozyten in Frage [Gruol *et al.* 1997]. Erhöhte Il-6-Spiegel im Gehirn werden bei zentralnervösen Erkrankungen wie Alzheimer, akuten Zerebralinfectionen und im Serum von Zirrhosepatienten mit HE gefunden [Bauer *et al.* 1991, Houssiau *et al.* 1988, Mani *et al.* 2009]. Eine erhöhte Il-6-Konzentration kann die

synaptische Übertragung im Hippokampus beeinflussen [Li *et al.* 1997] und die Freisetzung von GABA, einem inhibitorisch wirkenden Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, fördern [De Laurentiis *et al.* 2000].

Eine verstärkte GABAerge Neurotransmission konnte wiederholt bei hepatischer Enzephalopathie gezeigt werden [Cauli *et al.* 2009a]. Astrozyten und Neurone tragen beide zur Synthese von Il-6 bei und dessen Freisetzung kann prostanoidabhängig durch Exozytose vermittelt werden [Möller *et al.* 2006, Ma *et al.* 2005]. Demnach könnte der Zusammenhang zwischen erhöhtem Il-6-Expressionslevel und verminderter lokomotorische Aktivität bei PVL durch eine vermehrt inhibitorische Neurotransmission erklärt werden. Die Prostanoidabhängigkeit der beiden Parameter Il-6-Expression und lokomotorische Aktivität ist eine Übereinstimmung der aktuellen Arbeit zu vorangegangenen Studien.

In Bezug auf die iNOS-Expression wurde bei anderen Tiermodellen zur HE über zu dieser Arbeit gegensätzliche Ergebnisse berichtet. Während im Kleinhirn von Ratten, bei denen eine Zirrhose durch Thioacetamid induziert wurde, die iNOS-Expression unverändert blieb [Hernandez *et al.* 2004], konnte bei Ratten nach portocavaler Anastomose eine Hochregulation des Enzyms in Astrozyten nachgewiesen werden [Suarez *et al.* 2006]. In kortikalen *postmortem* Hirnbiopsien von mit hepatischer Enzephalopathie verstorbenen Zirrhosepatienten wie auch in dieser Doktorarbeit (Abb. 7A) konnte hingegen keine erhöhte iNOS-Expression nachgewiesen werden [Görg *et al.* 2010b].

4.3 Glutathomöostase bei hepatischer Enzephalopathie

Glutamat ist ein wichtiger Induktor für oxidativen Stress in Astrozyten und Neuronen [Görg *et al.* 2010a]. Kürzlich konnte eine gesteigerte Prostanoidbildung als Auslöser für ammoniakinduzierte Glutamatexozytose in kultivierten Rattenastrozyten identifiziert werden [Görg *et al.* 2010a]. Es wurde auch gezeigt, dass diese Glutamatexozytose eine Voraussetzung für die durch Ammoniak induzierte RNA-Oxidation ist.

Zusätzlich zur indomethazinempfindlichen Glutamatexozytose [Görg *et al.* 2010a] wurde eine gestörte Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt mit der

Pathobiologie der hepatischen Enzephalopathie in Verbindung gebracht. Eine Herunterregulation von astroglialen Glutamattransportern wurde sowohl bei portocaval geschunteten Ratten als auch bei ammoniakexponierten Astrozyten beschrieben. Extrazellulär erhöhte Glutamatspiegel könnten neben einer erhöhten Freisetzung auch durch eine verminderte Clearance durch Astrozyten aus dem synaptischen Spalt resultieren und damit eine Ursache für die glutamatvermittelte oxidative Stressantwort darstellen [Suarez *et al.* 2000, Chan *et al.* 2000]. Im vorliegenden PVL-Modell wurde jedoch kein Unterschied der Proteinexpression der glialen Glutamattransporter GLAST und Glt-1 zwischen portalvenös ligierten Ratten und Kontrollen gefunden.

4.4 Einfluss einer portalvenösen Ligatur auf lokomotorisches Verhalten

Die hepatische Enzephalopathie ist eine Erkrankung, welche in erster Linie anhand der klinischen Ausprägung und Symptome charakterisiert und eingeteilt wird [Häussinger *et al.* 2006 u. 2008, Ferenci *et al.* 2002]. Dementsprechend wurden in der Literatur auch verschiedene HE-Tiermodelle im Hinblick auf Änderungen von Verhalten und Kognition untersucht. Im Fokus der Untersuchung steht dabei häufig die lokomotorische Aktivität. Sowohl im Experimentalmodell der portocavalen Anastomose [Cauli *et al.* 2009b], als auch bei portalvenöser Ligatur (vorliegende Arbeit Abb. 10A und C) zeigten die Versuchstiere eine verminderte lokomotorische Aktivität nach Reduktion der Leberfunktion. Diese Verhaltensänderung konnte durch Verabreichung eines Cyclooxygenasehemmstoffs aufgehoben werden – im PCA-Modell durch Ibuprofen [Cauli *et al.* 2009b] und im PVL-Modell durch Indomethazin (vorliegende Arbeit Abb. 10B). Bei PCA-Tieren wurde postuliert, dass inflammationsassoziierte Veränderungen u. a. über eine Expressionsminderung der glialen Glutamattransporter zur Ausbildung HE-assoziiierter Symptome führt [Cauli *et al.* 2007 u. 2009b]. Die vorliegende Studie am PVL-Modell kann diese Hypothese nicht festigen. Die PVL-Ratten wiesen verminderte lokomotorische Aktivität und Rearingzeit auf, ohne Anzeichen einer Mikrogliaaktivierung, ohne vermehrter Produktion *pro*-inflammatorischer Zytokine wie Il-1 β und TNF- α sowie bei unveränderter Expression von Glt-1 und GLAST (Abb. 7B, 8, 9C, 9D, 10A, 10C, 10E). In der aktuellen Studie wurde eine indomethazinempfindliche Verminderung der lokomotorischen Aktivität bei erhöhten oxidativen Stress-Markern und Il-6-mRNA-Leveln im zerebralen Kortex gefunden (Abb. 5, 6, 8). Wie bereits vorangehend erwähnt könnte

hier die indomethazinempfindliche Glutamateroxytose ein Mediator des ammoniakinduzierten oxidativen Stresses darstellen. Andererseits könnte eine für HE charakteristische inhibitorische Neurotransmission prostanoindabhängig und damit vermutlich auch indomethazinempfindlich über Il-6-Expression und GABA vermittelt werden.

Ein anderer potentieller Mechanismus, über den Indomethazin eine Reduktion der zerebralen Protein-Tyrosin-Nitrierung bewirken könnte, ist der proteolytische Abbau von nitrierten Proteinen [Mani *et al.* 2006]. Eine genaue Aussage über den genauen Wirkmechanismus, über den Indomethazin oxidativen Stress im untersuchten Modell vermittelt, kann bei den vorhandenen Ergebnissen nicht getroffen werden. Hierfür sind weiterführende Analysen erforderlich.

5. Literaturverzeichnis

- Abbot NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy* 2002; 200: 629-38.
- Ahboucha S, Jiang W, Chatauret N, Marmer O, Baker GB, Butterworth RF. Indomethacin improves locomotor deficit and reduces brain concentrations of neuroinhibitory steroids in rats following portacaval anastomosis. *Neurogastroenterology & Motility* 2008; 20: 949-957.
- Bacon BR, deutsche Ausgabe: Klugewitz K, Somasundaram R. Leberzirrhose und ihre Komplikationen. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M. *Harrisons Innere Medizin* Band 2. Berlin 17. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag GmbH 2009; 2434-2445.
- Bajaj JS. Minimal hepatic encephalopathy matters in daily life. *World J Gastroenterology* 2008; 14: 3609-3615.
- Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, Volk B, Berger M. Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett* 1991; 285: 111-114.
- Ben Chaabane N, Melki W, Hellara O, Bdioui F, Saffar H. Hepatorenal syndrome. *Tunis Med* 2011; 89: 885-890.
- Benveniste EN, Huneycutt BS, Shrikant P, Ballestas ME. Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav Immun* 1995; 9: 304-314.
- Bertolotto A, Manzardo E, Guglielmone R. Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfated proteoglycan in the rat central nervous system. *Cell Tissue Res* 1996; 283: 283-295.
- Bidmon HJ, Wu J, Buchkremer-Ratzmann I, Mayer B, Witte OW, Zilles K. Transient changes in the presence of NO-synthases and nitrotyrosine immunoreactivity after focal cortical ischemia. *Neuroscience* 1998; 82: 377-395.
- Bjerring PN, Eefsen M, Larsen FS, Bernal W, Wendon J. Hypermagnesemia does not prevent intracranial hypertension and aggravates cerebral hyperperfusion in a rat model of acute hyperammonemia. *Hepatology* Jun 2011; 53: 1986-1994.
- Bosch J, García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *Journal of Hepatology* 2000; 32: 141-156.
- Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJ. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 452-70.
- Bühringer G, Augustin R, Bergmann E, Bloomfield K, Funk W, Junge B, Kraus L, Merfert-Diete C, Rumpf H-J, Simon R, Töppich J. *Alkoholkonsum und alkoholbezogene Störungen in Deutschland*. Nomos-Verlag 2000. Bd. 128.

- Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT; Members of the ISHEN Commission on Experimental Models of HE. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009; 29: 783–788.
- Carbonero-Aguilar P, Diaz-Herrero Mdel M, Cremades O, Romero-Gómez M, Bautista J. Brain biomolecules oxidation in portacaval-shunted rats. *Liver Int*. 2011; 31: 964–969.
- Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipo V. Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol* 2006; 45: 654–661.
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Boix J, Felipo V. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portocaval shunts. *Hepatology* 2007; 46: 514–519.
- Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, El Mlili N, Boix J, Augustí A, Felipo V. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2009a; 24: 69–80.
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Llansola M, Mansouri MT, Felipo V. Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *J Neurosci Res* 2009b; 87: 1369–1374.
- Celio MR, Blümcke I. Perineuronal nets—a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 1994; 19: 128–145.
- Chan CY, Lee FY, Wang TF, Huang SW, Chang FY, Lu RH, Chen YC, Wang SS, Hung HC, Lee SD. Lack of detrimental or therapeutic effects of cyclooxygenase inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1483–1487.
- Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int* 2000; 37: 243–248.
- Chang CC, Wang SS, Hung HC, Chan CY, Lee FY, Lin HC, Nong JY, Chuang CL, Lee SD. Selective cyclooxygenase inhibition improves hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure of rat. *Eur J Pharmacol* 2011; 666: 226–232.
- Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981; 240: 371–375.
- Chu CJ, Hsiao CC, Wang TF, Chan CY, Lee FY, Chang FY, Chen YC, Huang HC, Wang SS, Lee SD. Prostacyclin inhibition by indomethacin aggravates hepatic damage and encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 232–236.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 2001; 65: 1–105.
- De Laurentiis A, Pisera D, Lasaga M, Diaz M, Theas S, Duvilanski B, Seilicovich A. Effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on GABA release from mediobasal hypothalamus and posterior pituitary. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7: 77–83.

- Dejong CH, Deutz NE, Soeters PB. Cerebral cortex ammonia and glutamine metabolism in two rat models of chronic liver insufficiency-induced hyperammonemia: influence of pair-feeding. *J Neurochem* 1993; 60: 1047-1057.
- Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 2007; 14: 1189–1197.
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy – definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35: 716-721.
- García-Moreno LM, Conejo NM, González-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, Arias JL. Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 127–132.
- Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Foster N, Goerlich R, Schliess F, Häussinger D. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 2006; 449: 104–114.
- Görg B, Qvartskhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 2008; 48: 567–579.
- Görg B, Morwinsky A, Keitel V, Qvartskhava N, Schrör K, Häussinger D. Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* 2010a; 58: 691–705.
- Görg B, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. Oxidative stress markers in the brain of cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2010b; 52: 256–265.
- Gole MD, Souza JM, Choi I, Hertkorn C, Malcom S, Foust RF 3rd, Finkel B, Lancken PN, Ischiropoulos H. Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L961-67.
- Gow AJ, Duran D, Malcom S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996; 385: 63-66.
- Greenacre SA, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 2001; 34: 541-81.
- Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I, Hartmann IJ, Essink-bot ML, Hop WC, Schalm SW. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 1998; 28: 45-49.
- Gruol DL, Nelson TE. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 1997; 15: 307–339.

- Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Minana MD, Felipo V. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res* 1996; 21: 1237–1244.
- Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994; 107: 1475-1480.
- Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F. Protein Tyrosine Nitration in Hyperammonemia and Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* 2005; Vol. 20: 285-294.
- Häussinger D, Cordoba J, Kircheis G, Vilstrup H, Fleig W, Jones EA, Schliess F, Blei AT. Definition and assessment of low grade hepatic encephalopathy. In: Häussinger D, Kircheis G, Schliess F, eds. *Hepatic encephalopathy and nitrogen metabolism*. Dordrecht: Springer, 2006: 423–32.
- Häussinger D, Blei AT. Hepatic encephalopathy. In: Rodes J, Benhamon JP, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M., editors. *The Oxford textbook of hepatology*. Oxford: Blackwell; 2007. p. 728–760.
- Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 2008; 57: 1156–1165.
- Häussinger D, Görg B. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 87–92.
- Hernandez R, Martinez-Lara E, Del Moral ML, Blanco S, Canuelo A, Siles E, Esteban FJ, Pedrosa JA, Peinado MA. Upregulation of endothelial nitric-oxide synthase maintains nitric oxide production in the cerebellum of thioacetamide cirrhotic rats. *Neuroscience* 2004; 126: 879–887.
- Herold G, Heintges T. Leber. *Innere Medizin* 2007; 463-509.
- Hofer T, Seo AY, Prudencio M, Leeuwenburgh C. A method to determine RNA and DNA oxidation simultaneously by HPLC-ECD: greater RNA than DNA oxidation in rat liver after doxorubicin administration. *Biol Chem* 2006; 387: 103-11.
- Houssiau FA, Bukasa K, Sindic CJ, Van Damme J, Van Snick J. Elevated levels of the 26 K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. *Clin Exp Immunol* 1988; 71: 320–323.
- Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998 Aug 1; 356: 1-11.
- Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 776-83.
- Ischiropoulos H. Protein tyrosine nitration - an update. *Arch Biochem Biophys* 2009; 484: 117-21.

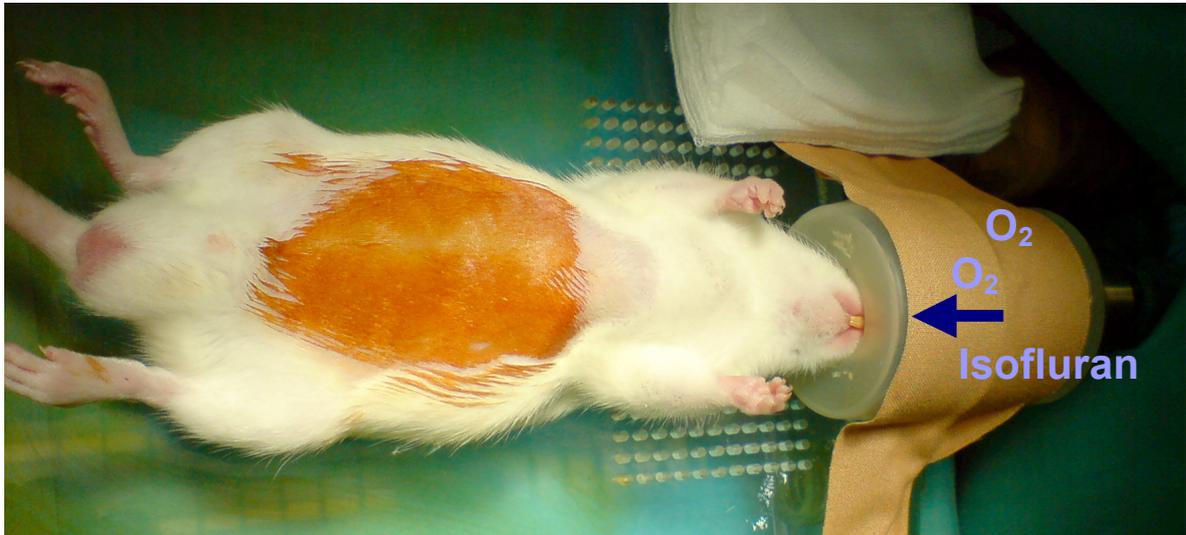
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 57: 1–9.
- Ji Y, Neverova I, Van Eyk JE, Bennett BM. Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione S-transferase by peroxynitrite. *J Biol Chem* 2006; 281: 1986–91.
- Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *J Neurochem* 2009; 109: 485–493.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91: 461–553.
- Kircheis G, Wettsein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2002; 35: 357–366.
- Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett* 1997; 229: 201–203.
- Kong Q, Lin CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 1817–29.
- Lemstra AW, Groen in't Woud JC, Hoozemans JJ, van Haastert ES, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, van Gool WA. Microglia activation in sepsis: a case-control study. *J Neuroinflammation* 2007; 4: 4.
- Li AJ, Katafuchi T, Oda S, Hori T, Oomura Y. Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1997; 748: 30–38.
- Lopez L, Cimadevilla JM, Aller MA, Arias J, Nava MP, Arias JL. Diurnal locomotor activity and oxidative metabolism of the suprachiasmatic nucleus in two models of hepatic insufficiency. *J Neurol Sci* 2003; 212: 93–97.
- Ma W, Quirion R. Up-regulation of interleukin-6 induced by prostaglandin E from invading macrophages following nerve injury: an in vivo and in vitro study. *J Neurochem* 2005; 93: 664–673.
- Mani AR, Ippolito S, Olsson R, Moore KP. Nitration of cardiac proteins is associated with abnormal cardiac chronotropic responses in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 847–856.
- Mani AR, Montagnese S, Jackson CD, Jenkins CW, Head IM, Stephens RC, Moore KP, Morgan MY. Decreased heart rate variability in patients with cirrhosis relates to the presence and degree of hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G330–G338.
- Mardini H, Smith FE, Record CO, Blamire AM. Magnetic resonance quantification of water and metabolites in the brain of cirrhotics following induced hyperammonaemia. *Journal of Hepatology* 2011; 54: 1154–1160.

- Marty S, Dusart I, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS-I. Microglia/macrophages. *Neuroscience* 1991; 45: 529–539.
- Michalak A, Knecht K, Butterworth RF. Hepatic encephalopathy in acute liver failure: role of the glutamate system. *Adv Exp Med Biol* 1997; 420: 35–43.
- Möller JC, Krüttgen A, Burmester R, Weis J, Oertel WH, Shooter EM. Release of interleukin-6 via the regulated secretory pathway in PC12 cells. *Neurosci Lett* 2006; 400: 75–79.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research* 1979; 161: 303–10.
- Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P. Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005; 20: 395–402.
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipe V. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2010; 139: 675–84.
- Rodríguez-Vilarrupla A, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC. Current concepts on the pathophysiology of portal hypertension. *Annals of Hepatology* 2007; 6: 28–36.
- Rose C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J Neurochem* 2007; 97: 11–15.
- Roselló DM, Balestrasse K, Coll C, Coll S, Tallis S, Gurni A, Tamaro ML, Lemberg A, Perazzo JC. Oxidative stress and hippocampus in a low-grade hepatic encephalopathy model: protective effects of curcumin. *Hepatology* 2008; 38: 1148–1153.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996; 16: 675–686.
- Savvides SN, Scheiwein M, Bohme CC, Arteel GE, Karplus PA, Becker K, Schirmer RH. Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem* 2002; 277: 2779–84.
- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* 2002; 16: 739–741.
- Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* 2004; 47: 21–29.
- Schuman EM, Dynes JL, Steward O. Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci* 2006; 26: 7143–7146.

- Scorticati C, Prestifilippo JP, Murer G, Lemberg A, Perazzo JC. Functional alterations in central nervous system of prehepatic portal hypertensive rats. [Article in Spanish] *Medicina (B Aires)* 2001; 61: 673-675.
- Scorticati C, Perazzo JC, Rettori V, McCann SM, De Laurentiis A. Role of Ammonia and Nitric Oxide in the Decrease in Plasma Prolactin Levels in Prehepatic Portal Hypertensive Male Rats. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13: 152-159.
- Sharma P, Sharma BC, Sarin SK. Critical flicker frequency for diagnosis and assessment of recovery from minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 2010; 9: 27-32.
- Shen H, Wang Y. Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. *J Neurosci Methods* 2010; 186: 150–154.
- Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Res* 2000; 859: 293–302.
- Suarez I, Bodega G, Arilla E, Felipo V, Fernandez B. The expression of nNOS, iNOS and nitrotyrosine is increased in the rat cerebral cortex in experimental hepatic encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32: 594–604.
- Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Strohlmann S, Ransohoff R. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 2007; 55: 360–368.
- Wein C, Koch H, Popp B, Oehler G, Schauder P. Minimal hepatic encephalopathy impairs fitness to drive. *Hepatology* 2004; 39: 739-745.
- Zemtsova I, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schrör K, Häussinger D. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology* Jul 2011; 54: 204-215.

6. Anhang

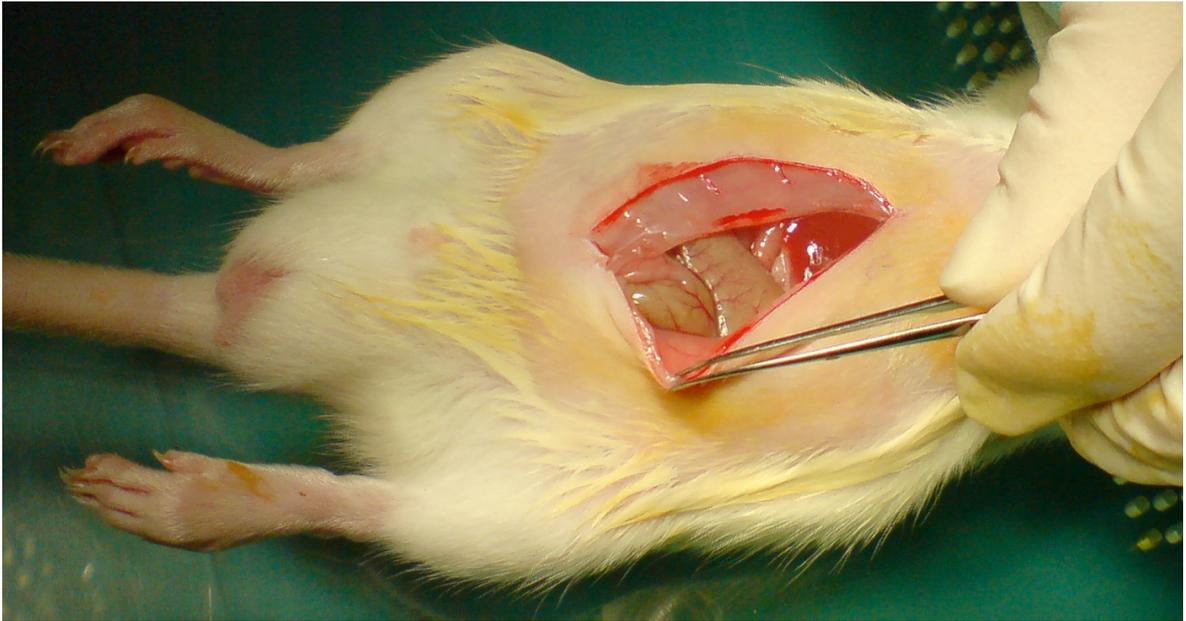
Fotodokumentation der Operation zur Anlage einer portalvenösen Ligatur an einer männlichen Wistar-Ratte



Das Versuchstier erhält eine Maskennarkose mittels Isofluranbeimischung zur Sauerstoffzufuhr (2%/98%). Das Hautareal ventral über dem Abdomen wird großzügig enthaart und sorgfältig desinfiziert.



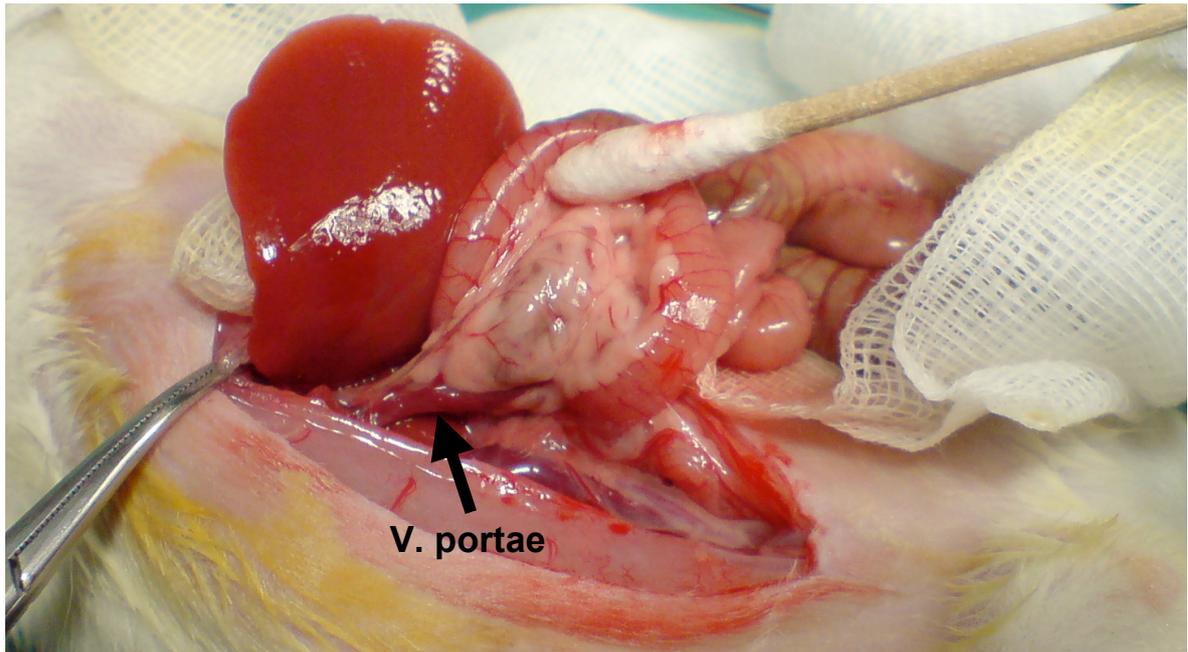
Es erfolgt eine Hautinzision entlang der Mittellinie.



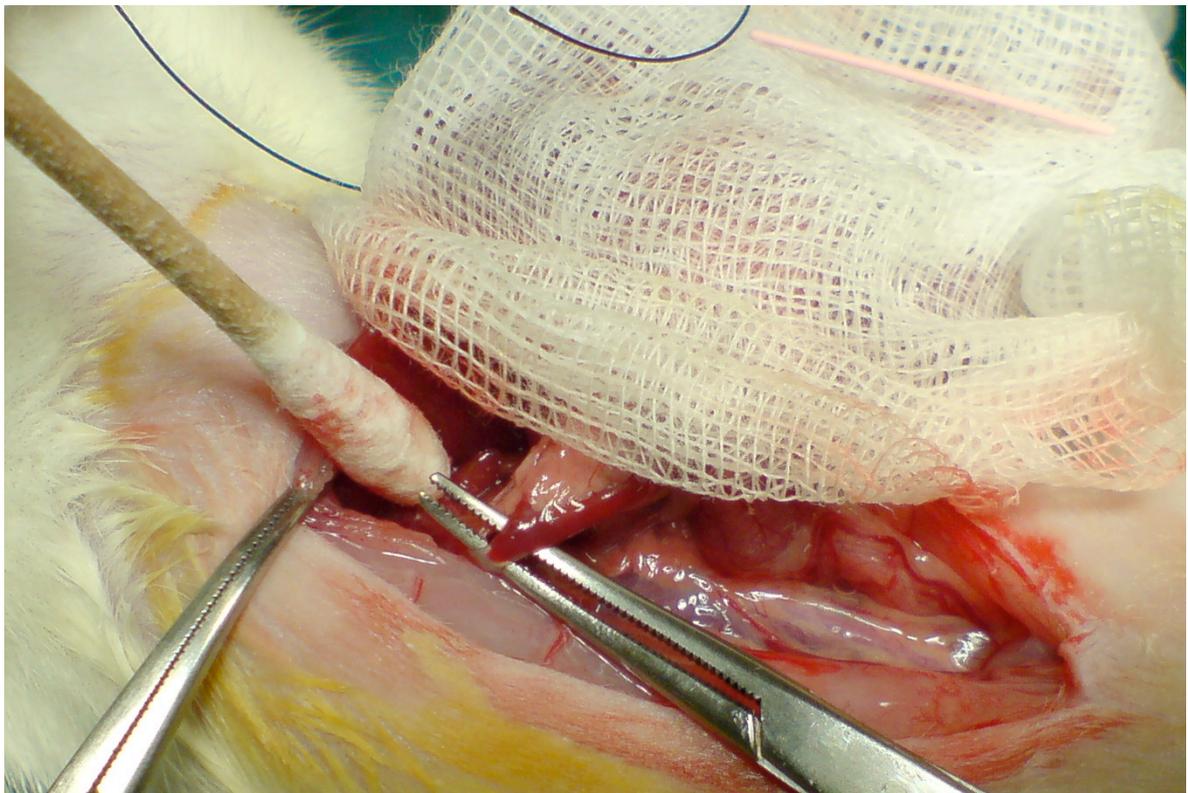
Die Abdominalhöhle wird vorsichtig eröffnet, indem Muskelschicht und Peritoneum durchtrennt werden.



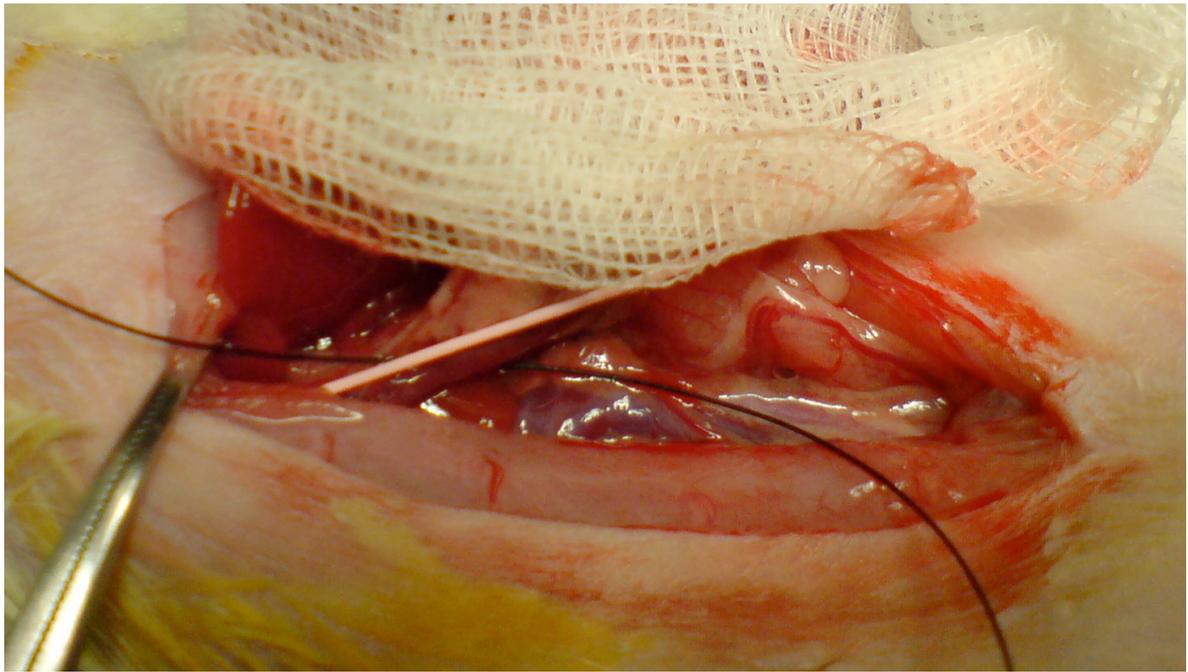
Eine Dosis von 125 IE Heparin wird intraperitoneal verabreicht.



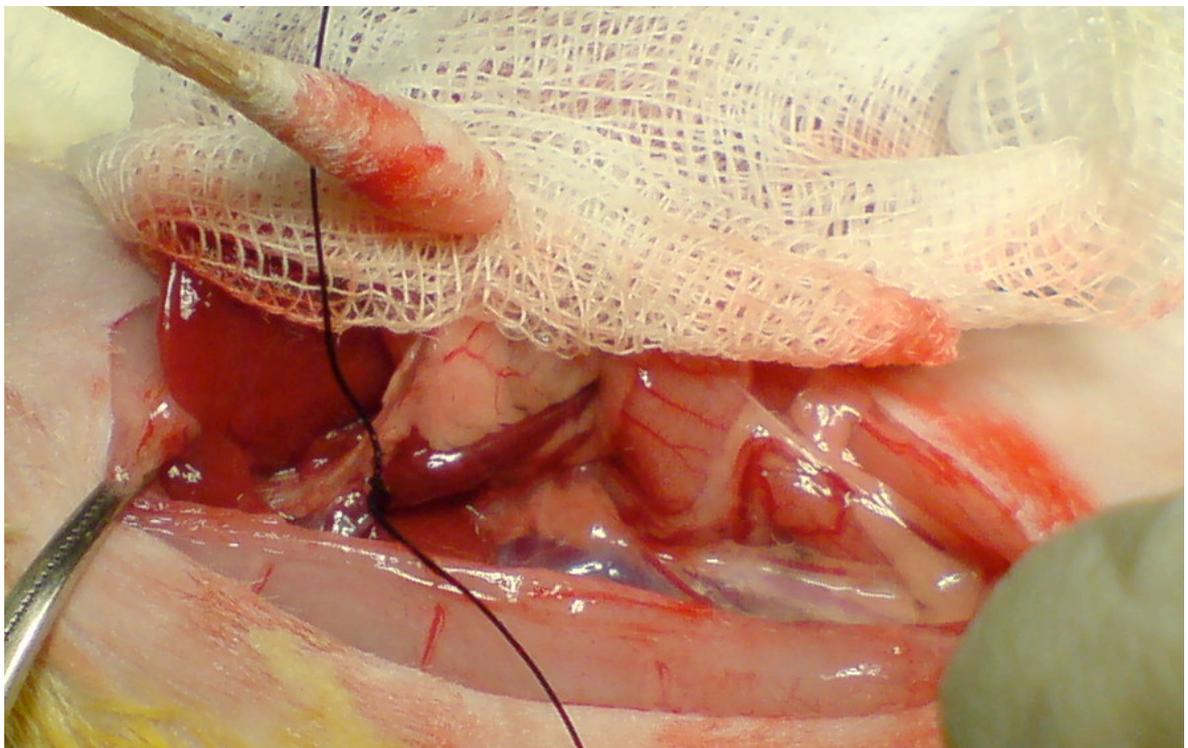
Durch Dislokation des Gastrointestinaltrakts nach extrakorporal wird der Zugang zur Leberpforte ermöglicht.



Die Pfortader wird sorgfältig freipräpariert und von Gallengang und Leberarterie isoliert.



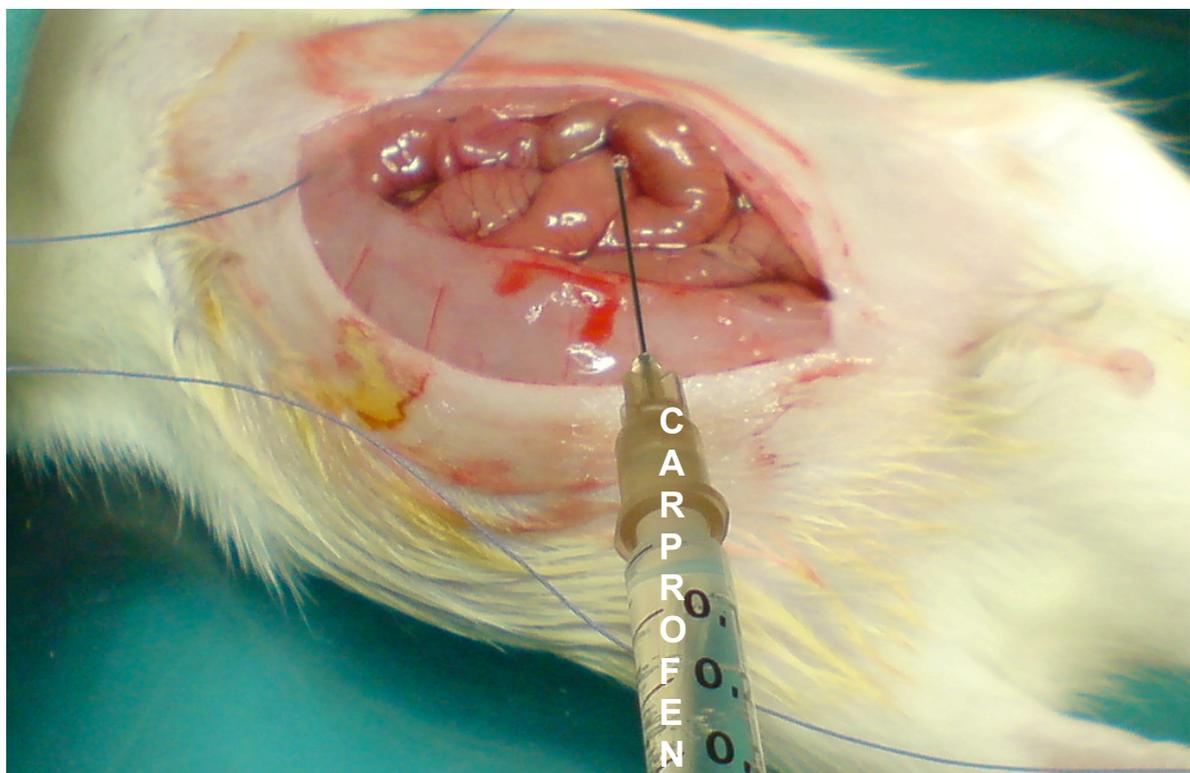
Ein steriler 2-0 Seidenfaden wird um die Pfortader gelegt und ein 20G-Mandrin auf dem Gefäß parallel zu seinem Verlauf platziert.



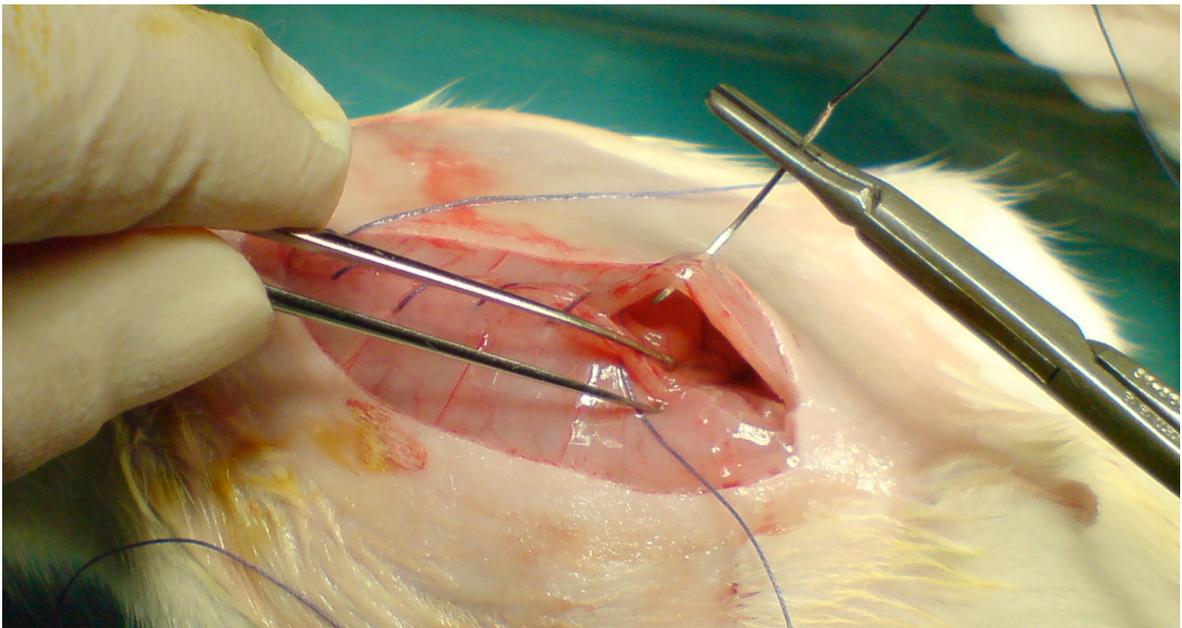
Der Seidenfaden wird verknotet und der Mandrin entfernt. In der Folge ist prästenotisch ein deutlicher Rückstau und poststenotisch ein feiner Restfluss von Pfortaderblut erkennbar.



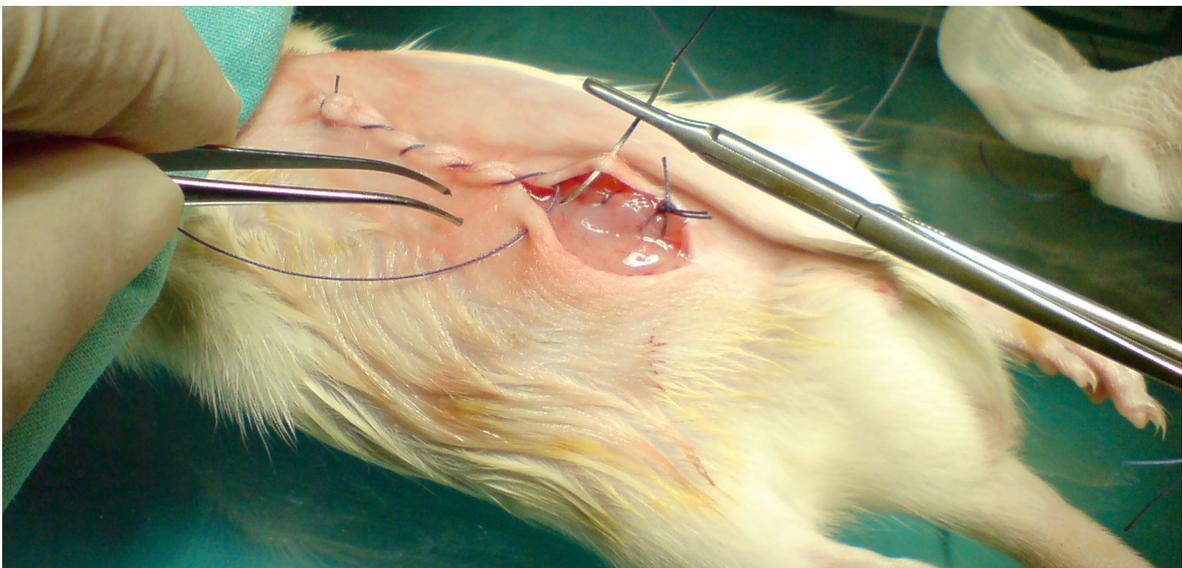
Um einem möglichen Flüssigkeitsverlust intraoperativ, sowie verzögerter Flüssigkeitsaufnahme postoperativ, entgegenzuwirken wird das Abdomen nach Relokation der Eingeweide vor seinem Verschluss mit 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt.



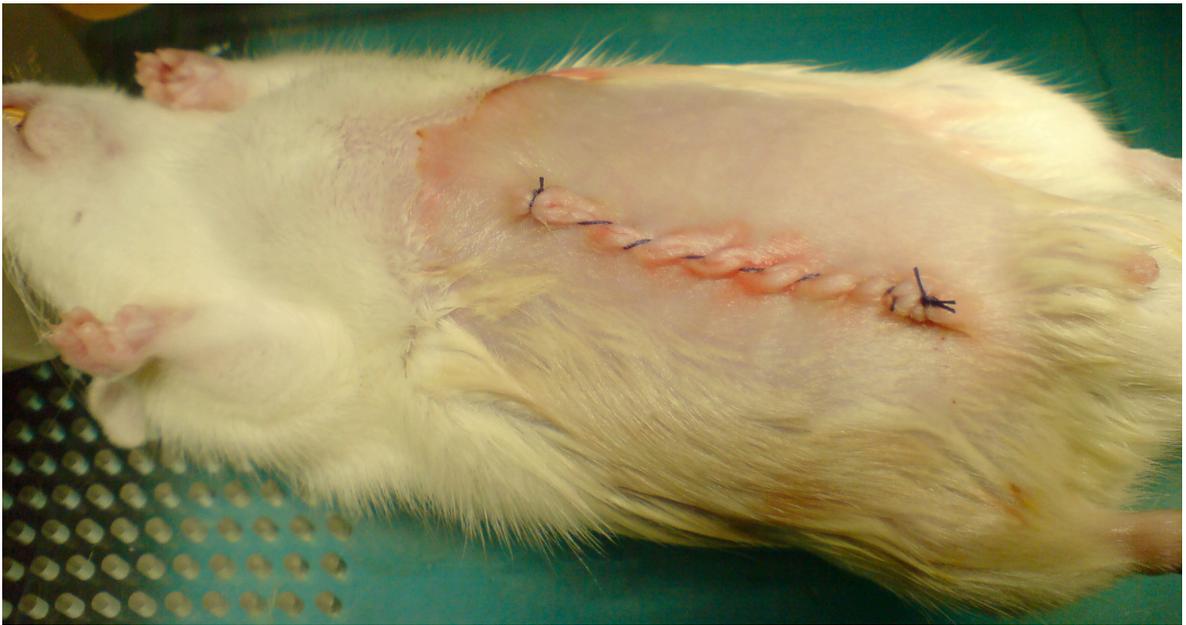
Zur Analgesie wird 1 mg/kg KG Carprofen intraperitoneal verabreicht.



Peritoneum und Muskulatur werden mit einem resorbierbaren 2-0 Nahtmaterial separat verschlossen.



Die Hautnaht wird ebenfalls mit einem resorbierbaren 2-0 Nahtmaterial durchgeführt.



Abschließend wird die Operationswunde gründlich desinfiziert, die Maskennarkose beendet und das Tier für einige Stunden engmaschig überwacht

Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger für die Möglichkeit der Ausführung meiner Promotionsarbeit an seiner Klinik. Insbesondere möchte ich ihm herzlich für die Überlassung des Promotionsthemas und für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Boris Görg für die intensive Betreuung und Unterstützung im Labor sowie für die rege wissenschaftliche Diskussion bedanken. Seine Flexibilität, Zuverlässigkeit und die damit verbundene hervorragende Zusammenarbeit haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Hans-Jürgen Bidmon, für die Hilfe bei der Proben-gewinnung sowie bei der Durchführung der Immunhistochemie.

Herrn TA Torsten Janssen danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung u. a. diverser Western-Blots sowie für seine organisatorischen Hilfestellungen. Ebenso danke ich allen übrigen Mitarbeitern und Forschungskollegen der „Experimentellen Hepatologie“, die immer wieder praktisch, fachlich und menschlich für mich da waren, sodass mir die Arbeit im Labor stets Freude bereitet hat.

Auch Frau Dr. Elena Borsch und Herrn Dr. Gerald Kircheis bin ich für die mit zeitlichem Aufwand verbundene Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuchsmaßnahmen zu großem Dank verpflichtet.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Sandra Berger, stellvertretend für das integrierte Graduiertenkolleg des SFB 575, bedanken für die Ermutigungen und das stets offene Ohr sowie die Förderung und Organisationsarbeit im Rahmen meines DFG-Stipendiums.

Zuletzt danke ich natürlich auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung meiner Arbeit während meines Forschungssemesters.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die hier vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

21.04.2014, Jonathan Brück