



**Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und
Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tom Lüdde

**Wirkung von Ammoniak auf die LPS-induzierte
Expressionssteigerung *pro*-inflammatorischer Zytokine in mono-
kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Katerina Lenz

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Alfons Schnitzler

Für meine wunderschöne Tochter Noemi, die mich zur stolzesten Mama macht.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

In Originalarbeiten:

Karababa A*, Groos-Sahr K*, Albrecht U, Keitel V, Shafigullina A, Görg B, Häussinger D. (2017), Ammonia Attenuates LPS-Induced Upregulation of Pro-Inflammatory Cytokine mRNA in Co-Cultured Astrocytes and Microglia. *Neurochemical Research* (42), Seite 737-749

Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Krankheitsbild, das als Komplikation nach akutem Leberversagen oder bei chronischen Lebererkrankungen auftreten kann. Bei der HE kommt es unter anderem zu einer Aktivierung von Mikroglia im Gehirn sowie systemischer Inflammation. Ammoniak spielt als Toxin eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HE und aktiviert Mikroglia *in vitro*, jedoch ohne die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine zu steigern.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Effekte Ammoniak auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Hochregulation von Mikrogliaaktivierungsmarkern und auf die Transkription und Freisetzung von Zytokinen hat. Dies wurde sowohl in Mikroglia Monokulturen als auch in Mikroglia/Astrozyten Kokulturen untersucht. Hierfür wurden die Zellkulturen mit verschiedenen Konzentrationen und für unterschiedliche Zeitdauern mit LPS, NH₄Cl oder LPS+ NH₄Cl inkubiert. Die Überstände der Zellkulturen wurden gesammelt und für Zytokinmessungen verwendet. Aus den Zellen wurde mRNA extrahiert und diese mittels Realtime-PCR analysiert.

In mono-kultivierter Mikroglia steigerte die Behandlung mit LPS (100ng/ml, 18h) die mRNA-Spiegel des Mikroglia Aktivierungsmarkers CD14 sowie die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α . Die gleichzeitige Behandlung der mono-kultivierter Mikroglia mit Ammoniak (NH₄Cl, 5mmol/l, 18h) hatte keinen Effekt auf die LPS-induzierte Hochregulation der mRNA-Spiegel von CD14, IL-1 α/β und IL-6, verstärkte jedoch die LPS-induzierte Hochregulation der mRNA-Spiegel von TNF- α . Die TGR5-Liganden Allopregnanolon und Tauroolithocholsäure verringerten die LPS-induzierte Hochregulation von IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α in mono-kultivierter Mikroglia. In mit Astrozyten ko-kultivierten Mikroglia wurden mRNA-Spiegel von CD14, IL-1 α/β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-12A/B und TGF β 1-3 ebenfalls durch LPS hochreguliert. In den Kokulturen wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit NH₄Cl die LPS-induzierte Hochregulation der mRNA-Spiegel von CD14, IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α signifikant abgeschwächt, nicht jedoch von IL-10, IL-12A/B oder TGF β 1-3. In mono-kultivierter Mikroglia schwächte NH₄Cl die LPS-induzierte Freisetzung von IL-6, IL-10 und MCP-1 ab.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Ammoniak die LPS-induzierte Mikroglia-Aktivierung über einen durch Astrozyten vermittelten Effekt abschwächt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass dieser anti-inflammatorische Effekt von Ammoniak durch von Astrozyten stammende Neurosteroiden getriggert wird. Diese Befunde könnten die kürzlich in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhose Patienten mit HE gefundene Abwesenheit von reaktiver Mikroglia erklären.

Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is associated with cerebral microglia activation and systemic inflammation. Ammonia, a main toxin of HE, activates microglia *in vitro* but does not trigger *pro*-inflammatory cytokine synthesis.

In the present study we analysed effects of ammonia on lipopolysaccharide (LPS)-induced upregulation of microglia activation marker and cytokine mRNA as well as on cytokine secretion in mono-cultured microglia and co-cultured astrocytes and microglia. In mono-cultured microglia LPS (100ng/ml, 18h) strongly elevated mRNA level of the microglia activation marker CD14 and the *pro*-inflammatory cytokines IL-1 α/β , IL-6 and TNF- α . NH₄Cl (5mmol/l) had no effect on LPS-induced upregulation of CD14, IL-1 α/β and IL-6 mRNA but enhanced LPS-induced upregulation of TNF- α mRNA in mono-cultured microglia. In co-cultured astrocytes and microglia, LPS-induced upregulation of IL-1 α/β , TNF- α , IL-6, CD14 but not of IL-10, IL-12A/B or TGF β ₁₋₃ was significantly attenuated in presence of NH₄Cl.

LPS also triggered release of IL-1 α/β , IL-6 MCP-1 and TNF- α from mono-cultured microglia and co-cultured astrocytes and microglia. LPS-induced release of MCP-1, IL-6 and IL-10 was diminished by NH₄Cl in mono-cultured microglia but not in LPS-treated co-cultured astrocytes and microglia.

LPS-induced upregulation of the *pro*-inflammatory cytokines IL-1 α/β , IL-6 and TNF- α was also attenuated in mono-cultured microglia by the TGR5-ligands allopregnanolone and tauroolithocholic acid.

The data suggest that ammonia attenuates LPS-induced microglia reactivity in co-cultured astrocytes and microglia but not in mono-cultured microglia. These *anti*-inflammatory effects of ammonia may be triggered by neurosteroids and may account for absence of microglia reactivity in cerebral cortex of cirrhotic patients with HE. (Karababa et al. 2017)

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CrP	C-reaktives Protein
CXCL	Chemokin (C-X-C) Ligand
CY3	Cyanin 3
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälber-Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
GPBAR1	<i>G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1</i>
HE	Hepatische Enzephalopathie
IBA1	Ionisiertes Kalzium-bindendes Adapter Protein 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
NH ₃	Ammoniak
NH ₄	Ammonium

NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBR	Peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
RNS	Reaktive Nitrogen Spezies
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TGR5	s. GPBAR1
TLC	Taurolithocholsäure
TLR	Toll- <i>like</i> Rezeptor
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
TTP	Tristetraprolin
Zn ²⁺	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die Standard-Einheiten des SI-Systems wurden nicht mit aufgenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hepatische Enzephalopathie	1
1.1.1	Formen der Leberschädigung	1
1.1.2	Klinische Stadien der hepatischen Enzephalopathie	5
1.1.3	Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	6
1.1.4	Therapie der hepatischen Enzephalopathie	14
1.2	Inflammation.....	17
1.2.1	Inflammation bei der hepatischen Enzephalopathie	18
1.3	Astrozyten	19
1.3.1	Funktionen.....	19
1.3.2	Bedeutung der Astrozyten für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	19
1.4	Mikroglia.....	20
1.4.1	Funktionen und Formen von Mikroglia	20
1.4.2	Bedeutung der Mikroglia für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien.....	22
2.1.2	Molekularbiologische Kits	23
2.1.3	Spezielle Materialien und Geräte	24
2.1.4	Primer für die quantitative Realtime-PCR.....	26
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Präparation, Kultivierung und experimentelle Handhabung von Astrozyten und Mikroglia aus dem Rattenkortex	27
2.2.2	<i>Realtime-</i> PCR.....	28
2.2.3	Quantifizierung der Zytokinmenge in Zellkulturüberständen	31
2.2.4	Immunfluoreszenzanalyse	31
2.3	Statistik	32
3	Ergebnisse.....	33

3.1	Effekte von NH ₄ Cl auf die mRNA Expression von Zytokinen und Mikrogliaaktivierungsmarkern in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen	33
3.2	Effekte von LPS auf die mRNA Expression von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und TLR-4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen	35
3.3	Effekte von Ammoniak auf LPS-induzierte mRNA Expressionsänderung von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungs-markern und TLR-4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.....	37
3.4	Effekte von Ammoniak auf die LPS-induzierte Freisetzung von Zytokinen in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen	39
3.5	Expression von TGR-5 in mono-kultivierter Mikroglia und Effekte von TGR-5-Agonisten auf die LPS-induzierte Expressionssteigerung <i>pro</i> -inflammatorischer Zytokine.....	43
4	Diskussion	45
4.1	Bedeutung von Ammoniak für Mikrogliaaktivierung und Inflammation	45
4.2	Bedeutung von Astrozyten für die LPS-induzierte Mikrogliaaktivierung <i>in vitro</i>	45
4.3	Effekte von Ammoniak auf die mRNA- und Protein-Spiegel <i>anti</i> -inflammatorischer Zytokine	46
4.4	Regulation des <i>anti</i> -inflammatorischen Zytokins IL-10.....	47
4.5	Regulation des LPS-Rezeptors TLR-4.....	47
4.6	Bedeutung von PGE ₂ für die Hemmung LPS-induzierter Mikrogliaaktivierung und Synthese <i>pro</i> -inflammatorischer Zytokine	48
4.7	Bedeutung von Neurosteroiden für die Hemmung LPS-induzierter Inflammation	48
4.8	Mikrogliaaktivierung im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE.....	49
4.9	Zusammenfassung.....	50
4.10	Limitationen der Arbeit	50
4.11	Ausblick.....	50
5	Abbildungsverzeichnis	51
6	Tabellenverzeichnis	52
7	Literaturverzeichnis.....	53

Einleitung

1.1 Hepatische Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine neuropsychiatrische Komplikation von hoher sozialmedizinischer Bedeutung, die in Folge eines akuten Leberversagens (ALV), eines akut-auf-chronischen Leberversagens (ACLV) oder einer Leberzirrhose auftreten kann. Hauptsächlich tritt sie bei Patienten mit Leberzirrhose auf (97%). Die Prävalenz der HE bei Zirrhose-Patienten liegt bei 20-70% (Häussinger 2004). Die Unterscheidung der genannten HE-Formen ist vor allem für die Prognose der Patienten von Bedeutung (Canbay und Gerken 2006).

1.1.1 Formen der Leberschädigung

1.1.1.1 Akutes Leberversagen

Beim akuten Leberversagen (ALV) handelt es sich um ein schweres Krankheitsbild, das ohne adäquate Therapie mit einer sehr hohen Letalität vergesellschaftet ist (Canbay et al. 2011). Beim ALV kann der Patient innerhalb weniger Wochen bis Monate nach Symptombeginn eine hepatische Enzephalopathie entwickeln, dieser Zustand ist jedoch potenziell reversibel (Trey und Davidson 1970).

Nach der amerikanischen „Acute Liver Failure Study Group“ werden nach zeitlichem Abstand zwischen Auftreten einer Koagulopathie (*International Normalized Ratio* > 1,5 als Zeichen einer Lebersynthesestörung) und hepatischer Enzephalopathie drei Formen des ALV unterschieden: das hyperakute (< 7 Tage), das akute (7-28 Tage) und das subakute (28 Tage-6 Monate) Leberversagen (O'Grady et al. 1989).

Zu den Hauptursachen des ALV zählen Virushepatitiden (hier v.a. HBV) und Intoxikationen (z.B. durch Paracetamol, Amanita, Phenprocoumon, Isoniazid), wobei in den letzten Jahrzehnten die toxische Leberschädigung, insbesondere durch Paracetamol, zugenommen hat. In einer retrospektiven Studie, in der 134 Patienten mit akutem Leberversagen in Deutschland in den Jahren 2002-2008 untersucht wurden, zeigte sich bei 39% eine toxische Leberzellschädigung, bei 23% eine akute Infektion durch hepatotrope Viren (Canbay et al. 2009).

Zu den selteneren Ursachen des ALV zählen toxische Schädigung durch Antibiotika und Phytopharmaka (Kava Kava, chinesischer grüner Tee), (Teschke 2009) oder Chemotherapeutika (durch lebertoxische Wirkung oder Reaktivierung einer latenten HBV-Infektion unter Immunsuppression). Auch Erkrankungen wie M. Wilson, Autoimmunhepatitis, Schwangerschaftsfettleber oder ein schwangerschaftsinduziertes HELLP-Syndrom (*Haemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet Count*) können zu einem akuten Leberversagen führen (Eisenbach et al. 2007; Lee et al. 2008).

1.1.1.2 Dekompensierte Leberzirrhose

Im Gegensatz zu einer Lebererkrankung mit akuter Dekompensation (ALV) kann eine chronische Leberschädigung unbehandelt zur Ausbildung einer Leberzirrhose mit knotig-fibrösem Parenchymbau und abnormer Zellaktivierung führen. Die Progression dieses strukturellen Umbaus resultiert früher oder später in einer eingeschränkten hepatischen Synthese- und Entgiftungsleistung. Zudem kommt es durch Veränderungen des hepatoportalen Gefäßbetts zu einem portalen Hypertonus. Weitere Komplikationen der Leberzirrhose sind die gastrointestinale Blutung (in 80% Ösophagusvarizen, (Augustin et al. 2011; Schepke et al. 2004)), Aszites (Gines et al. 1987), ein hepatozelluläres Karzinom (Forner et al. 2012) und die hepatische Enzephalopathie (Cholongitas et al. 2006). Die häufigsten Ursachen eines chronischen Leberschadens in Deutschland sind die alkoholische und nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus und Hepatitis-C-Virus (Koch und Herbers 2016).

1.1.1.3 Akut-auf-chronisches Leberversagen (ACLV)

Dem akut-auf-chronischen Leberversagen (ACLV) liegt eine unbehandelte chronische Lebererkrankung zugrunde. Eine global einheitliche Definition des ACLV liegt noch nicht vor. Die derzeit gültigen europäischen Diagnosekriterien des EASL-CLIF (*European Association of the Study of Liver- Chronic Liver Failure*) – Konsortiums beinhalten das Vorhandensein einer akuten Dekompensation, ein Organversagen nach objektivierbaren Maßstäben, eine hohe Kurzzeitsterblichkeit von > 15% (Bajaj et al. 2014; Moreau et al. 2013). Auslösende Faktoren eines ACLV werden in hepatische (akute Virushepatitis, Pfortaderthrombose, medikamentös-toxischer Leberschaden) und extrahepatische (Traumata, Varizenblutung, Infektion) unterschieden (Jalan et al. 2012).

Bakterielle Infektionen sind häufigster Trigger des ACLV, hierzu zählen v.a. Pneumonie, Harnwegsinfektionen und die Spontan Bakterielle Peritonitis (SBP) (Bruns et al. 2014). Als Folge der bakteriellen Infektion kommt es bei Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose unter anderem zu einer exzessiven Ausschüttung *pro*-inflammatorischer Zytokine (Arroyo et al. 2015; Moreau 2015). Dies induziert ein SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*). Es konnte gezeigt werden, dass beim ACLV die Höhe der Surrogatmarker eines SIRS (CrP oder Leukozytenzahl) mit der Anzahl versagender Organe korreliert (Jalan und Williams 2002). Der *pro*-inflammatorischen SIRS-Phase folgt die des kompensatorisch *anti*-inflammatorischen Response-Syndroms (CARS). Durch diese Phase der Immunsuppression erhöht sich das Risiko für weitere Infektionen bei Patienten mit ACLV. Dies ist eine mögliche Ursache der hohen Mortalität (Jalan et al. 2012; Wasmuth et al. 2005). Entscheidend ist daher, auslösende Faktoren wie Infektionen schnellstmöglich zu behandeln. Zur Beurteilung des klinischen Verlaufs und der Prognose hat sich der CLIF-C-OF Score etabliert (s. Tabelle). Hierbei werden anhand von 6 Organsystemen drei Schweregrade des ACLV unterschieden, dies lässt eine Aussage über die 30-Tage-Mortalität des Patienten zu. Neben der Nierenfunktion ist hierbei v.a. die hepatische Enzephalopathie entscheidend für das Outcome des Patienten (Cordoba et al. 2014; Sawhney et al. 2016).

In Folge einer akuten oder chronischen Leberschädigung können physiologische Entgiftungs- und Synthesefunktionen der Leber nicht mehr aufrechterhalten werden. Hiervon ist auch der Ammoniak betroffen, sodass in der Folge der Ammoniakspiegel im Blut ansteigt.

Durch eine chronische Leberschädigung kann es zur Ausbildung einer Leberzirrhose kommen. Aufgrund chronischer Entzündungsprozesse kommt es zu bindegewebigen Narben im Leberparenchym. Die Leber ist knotig verändert, der Anteil an funktionsfähigem Leberparenchym nimmt ab. Die Schwere der Leberzirrhose wird nach dem CHILD-Pugh-Score klassifiziert (Tabelle 1, Tabelle 2).

Tabelle 1: Child-Pugh-Klassifikation der Leberzirrhose.
(Child und Turcotte 1964; Pugh et al. 1973)

Parameter	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Serumalbumin (g/dl)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Bilirubin (mg/dl)	<2,0	2,0-3,0	>3,0
Quick (%)	>70	40-70	<40
Aszites in der Sonographie	kein	mittelgradig	massiv
Grad der hepatischen Enzephalopathie	keine	I-II	III-IV

Tabelle 2: 1-Jahres-Überlebensrate nach Child-Score

Die Punktzahlen ergeben sich aus der Addition der Punktwerte der in Tabelle 1 aufgeführten verschiedenen Parameter (Child und Turcotte 1964).

Stadium	Punktzahl	1-Jahres-Überleben
CHILD A	5-6	Ca. 100%
CHILD B	7-9	Ca. 85%
CHILD C	10-15	Ca. 35%

Aus der Schädigung der Leber resultieren im Verlauf bindegewebige Umbauprozesse aufgrund von chronischen Entzündungsprozessen und einer erschöpften Regenerationsfähigkeit. Aus dem knotigen Umbau resultiert ein reduzierter Blutfluss durch die Leber infolgedessen sich Umgehungskreisläufe ausbilden. Damit wird ein Teil des Blutes an der Leber vorbei transportiert, ohne hepatisch entgiftet zu werden. Zum anderen wird auch das Blut, welches durch die Leber geleitet wird, bei abnehmender hepatischer Entgiftungsfunktion nicht mehr entgiftet. Hieraus resultiert unter anderem ein erhöhter Ammoniakspiegel im Blut. Da Ammoniak die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, steigt auch der zerebrale Ammoniakspiegel. Im Gehirn führt dies zu einer erhöhten Glutaminbildung über die astrozytär exprimierte Glutaminsynthetase. In Folge des Ammoniak-Abbaus akkumuliert Glutamin in den Astrozyten (siehe auch Abbildung 1, Abbildung 2).

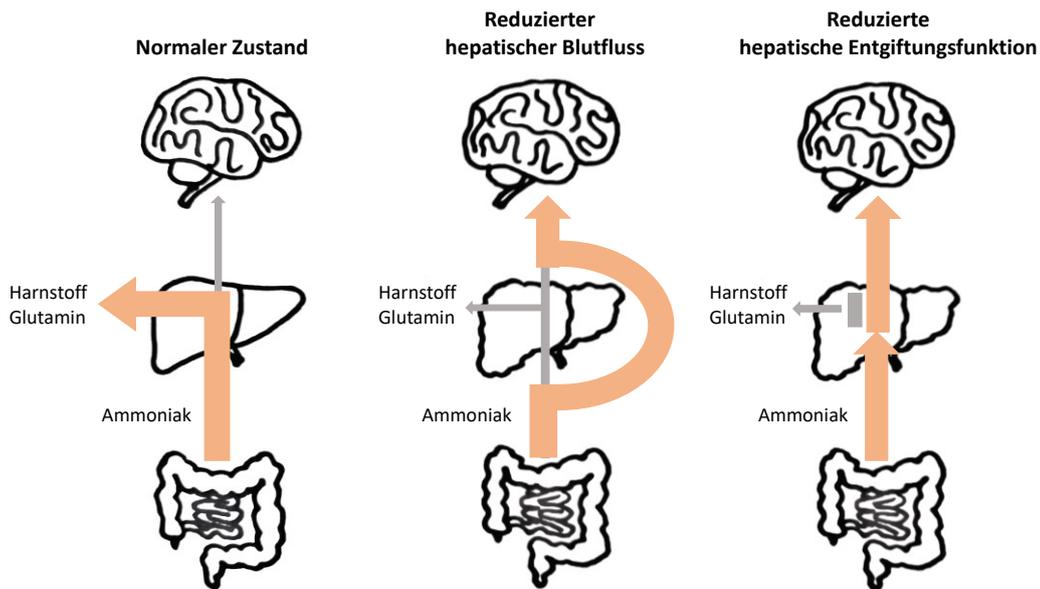


Abbildung 1: Auswirkung von Lebererkrankungen auf das zentrale Nervensystem

Im Darm anfallender Ammoniak wird beim Gesunden (Bild 1) über die Leber entgiftet. Bei reduziertem hepatischem Blutfluss (Bild 2) oder reduzierter hepatischer Entgiftungsfunktion (Bild 3) fällt vermehrt Ammoniak an, der auch ins Gehirn gelangt. Modifiziert nach (Gerok 1987)

1.1.2 Klinische Stadien der hepatischen Enzephalopathie

Im klinischen Alltag wird die manifeste hepatische Enzephalopathie in vier Schweregrade eingeteilt, abhängig von den beim Patienten beobachteten Symptomen (Tabelle 3). Je niedriger der Schweregrad, desto schwerer wird die objektive Bewertung, da z.B. Symptome der HE Grad I auch bei Patienten ohne chronische Lebererkrankung auftreten können (z.B. gestörter Schlaf-Wach-Rhythmus, Irritabilität). Neben der manifesten HE wird noch eine minimale Form unterschieden (mHE); dieses Stadium ist durch nicht offensichtliche Symptome gekennzeichnet und kann nur mittels verschiedener psychometrischer Testverfahren diagnostiziert werden, hierzu zählen der Mini-Mental-State-Test, der Number-Connection-Test, der Linien-Nachfahr-Test und der Number-Symbol-Test (Bajaj 2010; Prakash und Mullen 2010; Zhan und Stremmel 2012). Bei dieser Art von Testverfahren wird ein Schwerpunkt auf die Feinmotorik gelegt und es kann bei Wiederholungen zu einem Lerneffekt kommen, daher sind sie nur begrenzt für ein Screening auf minimale HE sinnvoll (Zhan und Stremmel 2012).

Neben den psychometrischen Testverfahren gibt es auch einige objektivierbare Untersuchungsverfahren, bei denen kein Lerneffekt auftritt. Hierzu zählt beispielsweise die Analyse der sogenannten „Kritischen Flimmerfrequenz“/ „Critical flicker frequency“ (CFF) (Kircheis et al. 2002). Hierbei fixiert der Patient eine oszillierende

Lichtquelle, deren Frequenz mit der Zeit abnimmt. Sobald ein Flimmern der Lichtquelle wahrgenommen wird, gibt der Patient einen Stimulus ab. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ist die Frequenz, bei der das Flimmern wahrgenommen wird, bei Patienten mit nur geringgradiger HE bereits signifikant reduziert. Mit zunehmendem Schweregrad der HE nimmt die Frequenz weiter ab (Kircheis et al. 2002). Des Weiteren zählen zu den objektivierbaren Tests die EEG-Untersuchung mit Nachweis triphasischer Wellen und die Ableitung sensomotorischer Potenziale (Bajaj 2010; Prakash und Mullen 2010).

Der Etablierung objektiver Testverfahren wie der „Critical flicker frequency“ kommt eine große klinische Bedeutung zu, da Patienten bereits im Stadium der minimalen subklinischen hepatischen Enzephalopathie Einschränkungen der Aufmerksamkeit zeigen können, die sich unter anderem auch auf die Fahrtüchtigkeit auswirken können (Kircheis et al. 2009).

Tabelle 3: Schweregrade der hepatischen Enzephalopathie.

Die Stadien „Minimale HE“ (mHE) und die Grade I und II der „Manifesten HE“ werden zur *Low Grade HE* zusammengefasst, hierbei werden Symptome beschrieben, die nicht objektivierbar sind. Die Grade III und IV der „Manifesten HE“ werden zur *High Grade HE* zusammengefasst (Häussinger et al. 2006).

Low Grade	}	Manifeste HE	}	Minimal HE (mHE)	Keine klinischen Symptome, nur durch neurophysiologische Test erfassbar
				Grad I	Änderungen der Persönlichkeit, kurze Aufmerksamkeitsspanne, Irritabilität, gestörter Schlaf-Wach-Rhythmus, Mini-Asterixis (Flattertremor)
High Grade	}	}	}	Grad II	Lethargie, Müdigkeit, Vergesslichkeit, Asterixis, leichte Desorientiertheit
				Grad III	Somnolenz, Stupor, Antwort auf verbale Stimuli, grobe Desorientiertheit
				Grad IV	Koma (fehlende Antwort auf verbale Stimuli oder Schmerz)

1.1.3 Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

HE bei chronischer Leberschädigung wird durch eine äußerst heterogene Gruppe unterschiedlicher Faktoren verursacht. Hierzu zählen unter anderem Hyperammonämie, Hyponatriämie, Inflammation, metabolische Azidose oder Sedativa aus der Familie der Benzodiazepine (Häussinger und Schliess 2008). Symptome der HE umfassen

hauptsächlich kognitive Defizite und motorische Beeinträchtigungen (Häussinger und Schliess 2008; Häussinger und Sies 2013). Die HE manifestiert sich in Patienten mit chronischer Lebererkrankung klinisch als niedriggradiges zerebrales Ödem (Häussinger et al. 2000; Häussinger et al. 1994; Häussinger und Sies 2013), welches mit zerebralem oxidativ/nitrosativem Stress (Görg et al. 2010b; Häussinger und Sies 2013), Veränderung der zerebralen Genexpression (Görg et al. 2013), Einleitung von Seneszenz (Görg et al. 2015) und Aktivierung von Mikroglia (Andersson et al. 2005; Dennis et al. 2014; Zemtsova et al. 2011) assoziiert ist.

Das zerebrale Ödem exazerbiert abhängig von der Stärke der auslösenden Faktoren. Hierbei kommt es zu einer durch Ammoniak vermittelten Erschöpfung der volumenregulatorischen Kapazität der Astrozyten (Abbildung 2).

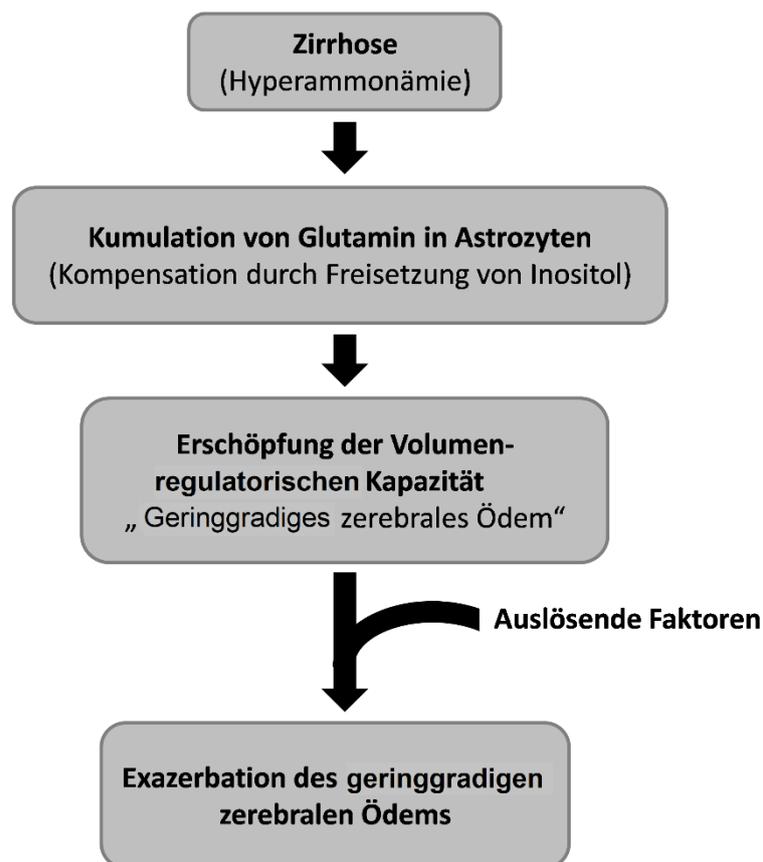


Abbildung 2: Entstehung und Exazerbation des geringgradigen zerebralen Ödems bei der HE. (Häussinger et al. 2000)

1.1.3.1 Ammoniakstoffwechsel in der Leber

Ammoniak wird bei verschiedenen Stoffwechselprozessen im Körper gebildet. Der größte Teil (ca. 75%) entsteht dabei im Intestinaltrakt im Stoffwechsel anaerober Bakterien (Center und Magne 1990). Ein kleinerer Teil fällt bei der Proteolyse in der Leber an (Gerber und Schomerus 2000). Da freier Ammoniak zelltoxisch wirkt, muss er rasch metabolisiert werden. Im Harnstoffzyklus werden die Ammoniumionen zu wasserlöslichem Harnstoff umgewandelt ((Häussinger und Gerok 1984), Abbildung 3). Harnstoff ist im Gegensatz zu Ammoniak ungiftig für die Zellen und kann mit dem Urin über die Niere ausgeschieden werden. Ammoniak, der nicht im Harnstoffzyklus in Harnstoff fixiert wird, wird durch die Glutaminsynthetase der hepatischen Scavenger-Zellen an Glutamat gebunden. Dies geschieht durch Glutaminbildung, die durch das Enzym Glutaminsynthetase bewerkstelligt wird (Abbildung 4). Im gesunden Organismus besteht so ein Gleichgewicht zwischen Anfall und Abbau von Ammoniak und es wird eine Serumkonzentration von etwa 30 $\mu\text{mol/l}$ aufrechterhalten (Häussinger 1990).

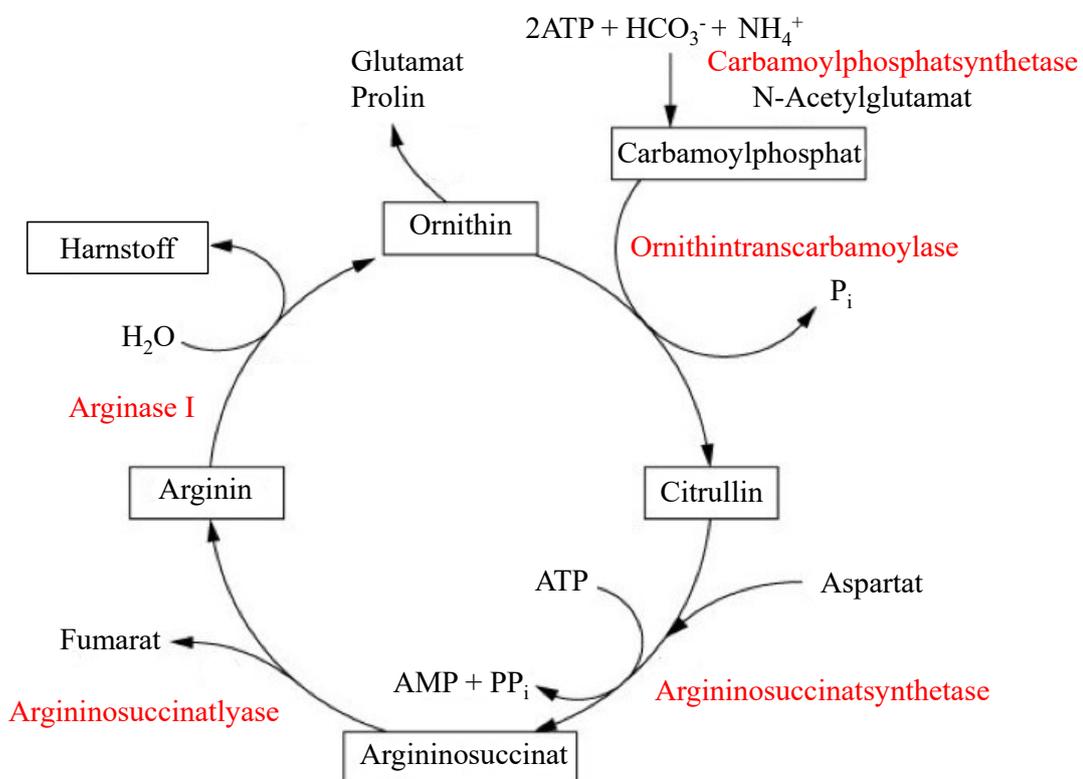


Abbildung 3: Harnstoffzyklus

Enzymatische Abläufe und Produkte des Harnstoffzyklus. Die beteiligten Enzyme sind rot markiert. (Abbildung modifiziert nach Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2001).

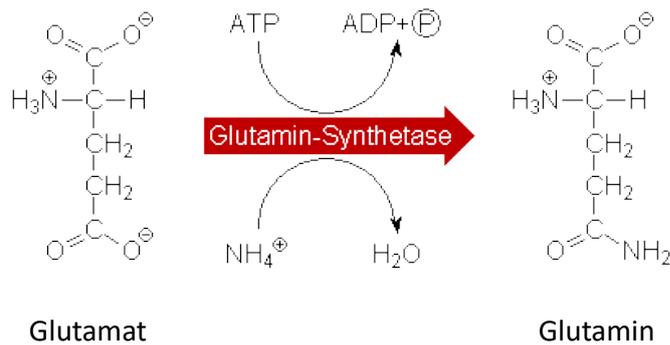


Abbildung 4: Synthese von Glutamin durch die Glutaminsynthetase.

Das Enzym Glutaminsynthetase kann unter Verbrauch von ATP Glutamin aus Glutaminsäure (Glutamat) und Ammoniumionen bilden.

In der Leber bildet ein Leberazinus eine funktionelle Einheit (Abbildung 5). Die periportalen Hepatozyten unterscheiden sich von den perivenösen Hepatozyten in ihrer enzymatischen Ausrüstung und der metabolischen Funktion („metabolische Zonierung“) (Häussinger 1990). Im intakten Leberazinus läuft in periportalen Hepatozyten der Harnstoffzyklus ab, ebenso findet sich hier das Enzym Glutaminase, welches Glutamin in Glutamat und Ammoniak spaltet. In den perivenösen Hepatozyten dagegen findet kein Harnstoffzyklus statt, hier findet sich das Enzym Glutaminsynthetase, welches Ammonium unter Verbrauch von ATP auf Glutamat überträgt (Abbildung 4). Diese strikte Verteilung der Enzyme ist eine Besonderheit der Säugetierleber (Smith und Campbell 1988). Die beiden Haupt-Entgiftungswege für Ammoniak sind anatomisch hintereinandergeschaltet. Dabei erfolgt zuerst die Entgiftung über den periportalen Harnstoffzyklus. Dieser arbeitet mit einer hohen Kapazität, jedoch mit niedriger Affinität für Ammoniak ($K_m = 1-2 \text{ mM}$ für Carbamoylphosphatsynthetase) (Lusty 1978). Dem Harnstoffzyklus nachgeschaltet ist die perivenöse Glutaminsynthese durch die Glutaminsynthetase in den sogenannten „Scavenger Zellen“, welche eine hohe Affinität zu Ammoniak hat ($K_m = 0,3 \text{ mM}$, (Deuel et al. 1978)).

Eine weitere Besonderheit ist, dass der Harnstoffzyklus und damit die Leber eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes und des Säure-Basen-Haushaltes spielen. Die periportale Glutaminase agiert hierbei als pH- und ammoniakmodulierte Schaltstation, die über eine Verstärkung des Ammoniak-Angebots die Aktivität des Harnstoffzyklus reguliert (Häussinger et al. 1986). In der ersten

Reaktion des Harnstoffzyklus durch die Carbamoylphosphatsynthetase wird Bikarbonat (HCO_3^-) irreversibel verbraucht. Im Falle einer metabolischen Azidose wird daher die Ammoniak-Entgiftung über den Harnstoffzyklus zugunsten der Glutaminsynthese reduziert, damit wird Bikarbonat eingespart, ohne eine Hyperammonämie zu induzieren (Atkinson und Camien 1982; Häussinger 1986).

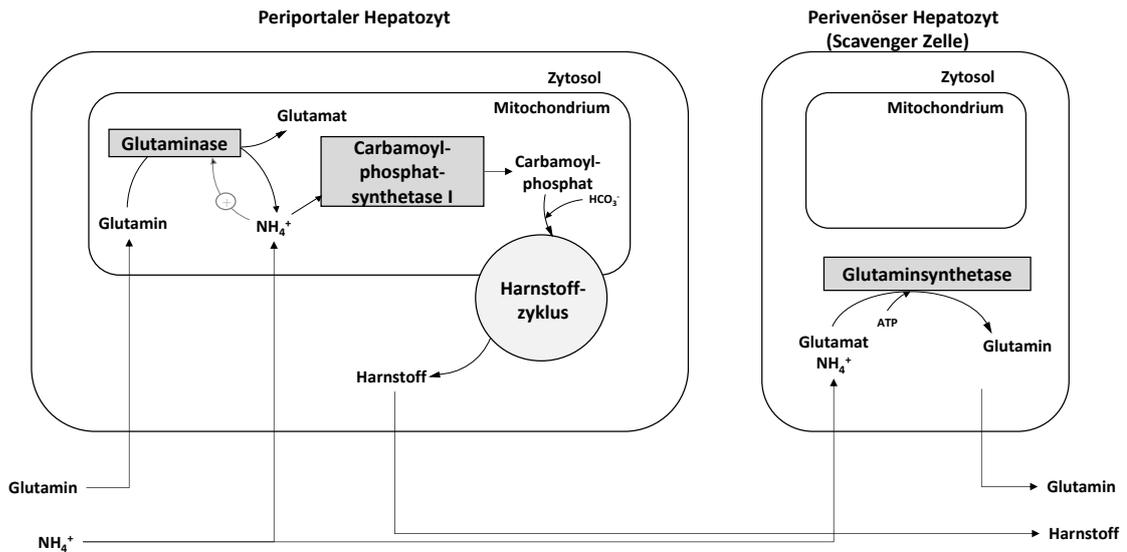


Abbildung 5: Intrahepatische Metabolisierung von Ammoniak.

In periportalen Hepatozyten wird Ammoniak im Harnstoffzyklus durch Synthese von Harnstoff mit hoher Kapazität aber niedriger Affinität entgiftet. Die leberspezifische Glutaminase erhöht die Flussrate im Harnstoffzyklus, indem sie Glutaminolyse-vermittelt die Ammoniakkonzentration im Hepatozyten steigert. Ammoniak, der einer Entgiftung im Harnstoffzyklus entkommt, wird in den nachfolgenden Scavenger-Zellen durch die dort exprimierte Glutaminsynthetase und der Bildung von Glutamin mit hoher Affinität aber nur niedriger Kapazität entgiftet. Abbildung modifiziert nach (Häussinger et al. 1990).

Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Leber Harnstoff aus Ammoniak zu gewinnen bei einer chronischen Leberschädigung um bis zu 80% reduziert ist (Häussinger et al. 1990; Kaiser et al. 1988). Ebenso ist die Fähigkeit der Glutaminsynthese in den Scavenger Zellen vergleichbar beeinträchtigt. Entgegengesetzt dazu steigt jedoch die Aktivität der periportalen Glutaminase an (Kaiser et al. 1988). Da der Harnstoffzyklus ein Hauptweg für den irreversiblen Verbrauch von Bikarbonat ist, kann eine signifikante Abnahme der Aktivität des Harnstoffzyklus zu einer Anhäufung von Bikarbonat und damit zu einer metabolischen Alkalose führen (Häussinger et al. 1990; Kaiser et al. 1988). Ein alkalischer pH wiederum stimuliert die periportale

Glutaminase, welche dann durch eine vermehrte Bereitstellung von Ammoniak die Aktivität des Harnstoffzyklus steigert und damit ein Gleichgewicht und zunächst eine nahezu normale Harnstoffausscheidung bei Patienten mit chronischer Leberschädigung ermöglicht (Häussinger 1990).

Eine Leberfunktionsstörung führt im Verlauf zu einem Ungleichgewicht zwischen Anfall und Abbau von Ammoniak, es kommt zu erhöhten Konzentrationen von Ammoniak im Serum. Es besteht jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen Höhe der Serum-Ammoniakkonzentration und Schweregrad der HE (Ong et al. 2003).

Ammoniak kann über unterschiedliche Wege ins Gehirn gelangen. Zum einen als nicht-ionisierte Form (NH_3) via Diffusion über die Blut-Hirn-Schranke, zum anderen als protonierte Form (NH_4^+) via Transportsysteme ins zerebrale Parenchym (Wetterling 2002).

1.1.3.2 Oxidativ/nitrosativer Stress bei hepatischer Enzephalopathie

Das bei Patienten mit HE beobachtete zerebrale Ödem ist Folge einer osmotischen Schwellung der Astrozyten. Ursächlich hierfür ist eine durch Ammoniak vermittelte Kumulation von Glutamin in den Astrozyten. Astrozyten besitzen ebenfalls die Fähigkeit über das Enzym Glutaminsynthetase Ammoniak in Glutamin zu binden.

Die Ausbildung eines zerebralen Ödems ist eng vergesellschaftet mit der Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress. Sowohl oxidativ/nitrosativer Stress als auch die Astrozytenschwellung werden unter anderem durch inflammatorische Zytokine, Benzodiazepine oder hypoosmotische Bedingungen ausgelöst. Damit bilden sie eine gemeinsame pathogenetische Endstrecke unterschiedlicher HE-auslösender Faktoren. Daraus ergibt sich, dass unterschiedlichste klinische Situationen und Veränderungen Episoden hepatischer Enzephalopathie auslösen können. Zudem bedingen und verstärken sich oxidativ/nitrosativer Stress und Astrozytenschwellung gegenseitig (Abbildung 6) (Häussinger und Schliess 2008; Lachmann et al. 2013). Man weiß heute, dass die funktionellen Folgen von oxidativ/nitrosativem Stress bedeutend sind für die Pathogenese der HE. Zu den Folgen zählen die Oxidation von RNA-Spezies, die Tyrosin-Nitrierung von Proteinen, Veränderungen der Genexpression und Störung von intrazellulären Signalwegen (Görg et al. 2013). Bei Ratten mit induzierter Hyperammonämie konnte oxidierte RNA in Astrozyten, aber auch in Neuronen

nachgewiesen werden. Besonders bedeutend ist jedoch der Nachweis von oxidiertem RNA entlang von Dendriten und im Bereich der postsynaptischen dendritischen Region. Dies lässt vermuten, dass RNA-Spezies, die eine wichtige Rolle bei der Synthese postsynaptischer Proteine spielen, durch den HE-assoziierten oxidativen Stress modifiziert werden. Die postsynaptische Protein-Synthese ist grundlegend für synaptische Plastizität, die Ausbildung eines Langzeit-Gedächtnisses und die Fähigkeit zu lernen (Lynch 2004). Daher wurde vermutet, dass die Oxidation von RNA über eine Störung der Proteinsynthese an Synapsen neuronale Funktionen bei der HE beeinträchtigt.

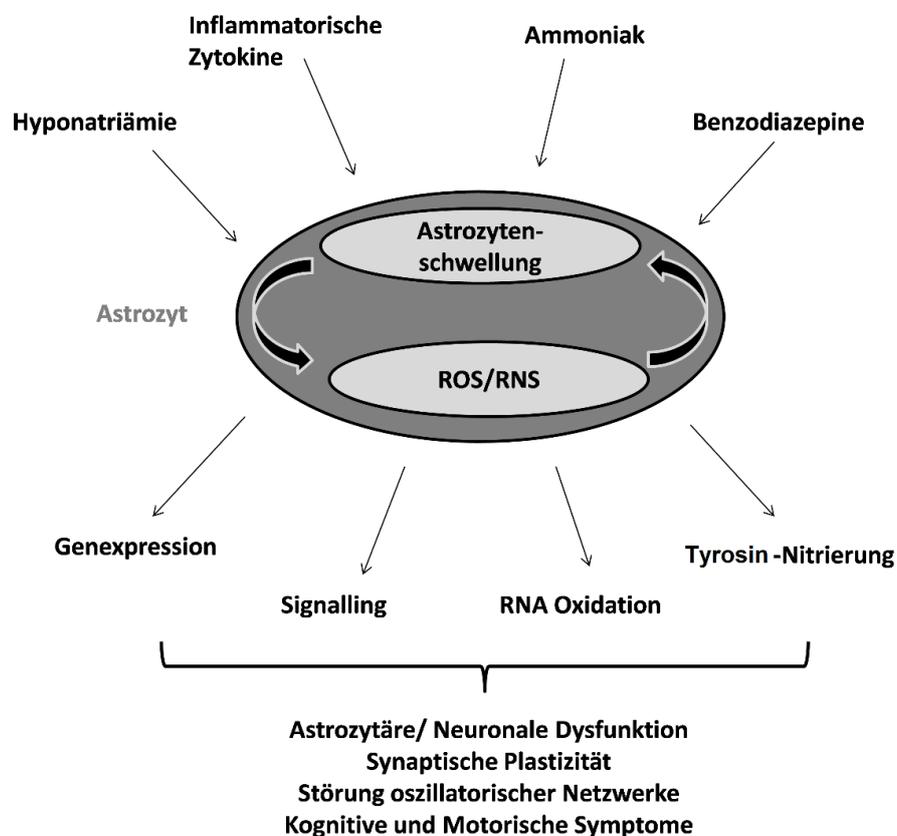


Abbildung 6: Modell zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie.

Die Astrozytenschwellung ist gemeinsame Endstrecke verschiedener heterogener HE-auslösender Faktoren. Die Schwellung aktiviert die Bildung reaktiver Nitrogen- und Sauerstoff-Spezies (RNOS). RNOS und Schwellung verstärken sich gegenseitig. In der Folge werden hierdurch verschiedene funktionalbedeutsame molekulare Mechanismen in Gang gesetzt. In der Gesamtheit wird hierdurch die Astrozytenfunktion beeinträchtigt und in der Folge die astrozytäre/neuronale Kommunikation und oszillatorische Netzwerke im Gehirn gestört. Modifiziert nach (Häussinger und Schliess 2008).

Eine Hyperammonämie allein kann sicherlich nicht die *in vivo*-Situation bei Patienten mit HE vollständig repräsentieren, jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Hyperammonämie bereits ausreicht, um eine zerebrale RNA-Oxidation sowie Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen auszulösen (Qvartskhava et al. 2015), wie sie auch in *post mortem* Hirnproben von Patienten mit hepatischer Enzephalopathie gefunden wurden (Görg et al. 2010).

Wichtig ist hierbei, dass erhöhte Spiegel oxidativer Stressmarker im zerebralen Kortex von Patienten mit Leberzirrhose und hepatischer Enzephalopathie, jedoch nicht in dem ohne hepatische Enzephalopathie gefunden wurden (Görg et al. 2013). Die Ergebnisse zeigen, dass zerebraler oxidativer Stress eng vergesellschaftet ist mit dem Vorliegen einer hepatischen Enzephalopathie und bereits durch die Leberzirrhose per se induziert wird.

1.1.3.3 Neurosteroide und der TGR5-Rezeptor bei der hepatischen Enzephalopathie

Neurosteroide (NS) werden im Gehirn sowie von endokrinen Drüsen gebildet (Baulieu 1998). Im ZNS werden NS von Gliazellen und insbesondere von Astrozyten gebildet (Ahboucha und Butterworth 2008).

Neurosteroide modulieren die neuronale Erregbarkeit über die Bindung an Ionen-Kanäle, wie den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure-Rezeptor (GABA-Rezeptor) (Lan und Gee 1994; Paul und Purdy 1992). Hierüber vermitteln sie Veränderungen der neuronalen Plastizität (Benarroch 2007), des Lernens und der Gedächtnisbildung (Vallee et al. 2001). Des Weiteren beeinflussen NS den Schlaf-Wach-Rhythmus (Müller-Preuss et al. 2002).

In Astrozyten wurde eine Hochregulation des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR) als Folge von nitrosativem Stress durch HE-relevante Faktoren diskutiert (Kruczek et al. 2007). Diese erfolgt über eine Mobilisierung von Zink (Zn^{2+}) aus Zinkthiolat Clustern, über die eine Proteinkinase-C-abhängige Akkumulation des Transkriptionsfaktors SP1 im Zellkern vermittelt wird. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Transkription des PBR (Giatzakis und Papadopoulos 2004).

Im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE fanden sich sowohl PBR-Bindungsstellen (Lavoie et al. 1990) als auch Neurosteroidlevel (Ahboucha et al. 2005, 2006) erhöht.

Diese Ergebnisse stimmen mit der Annahme einer Beteiligung des PBR an einer gesteigerten Neurosteroidsynthese bei HE überein.

Neurosteroidoide haben eine hohe Affinität zum Gallensalzrezeptor G-Protein-gekoppelter Rezeptor (TGR5) (Keitel et al. 2010). Im Gehirn wird der TGR5 von Neuronen, Mikroglia und Astrozyten exprimiert (Keitel et al. 2010; McMillin et al. 2015). Eine Aktivierung des TGR5 durch Neurosteroidoide in Astrozyten *in vitro* induziert die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) und erhöht hierüber die intrazelluläre Konzentration freier Kalziumionen, dies wiederum ist essenziell für durch Ammoniak induzierten oxidativ/nitrosativen Stress (Keitel et al. 2010; Görg et al. 2013). Interessanterweise sind die TGR5 Proteinlevel in mit Ammoniak behandelten Astrozyten *in vitro* und auch in *post mortem* Hirnproben von Zirrhose-Patienten mit HE herunterreguliert (Keitel et al. 2010). Dies lässt einen Einfluss des TGR5 auf durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress bei HE fraglich erscheinen.

Neben Veränderungen des PBR und des TGR5 wurden bereits Veränderungen diverser anderer Neurotransmitter und ihrer Liganden beschrieben, von denen man annimmt, dass sie zur Pathogenese der HE beitragen (Palomero-Gallagher und Zilles 2013; Sergeeva 2013).

1.1.4 Therapie der hepatischen Enzephalopathie

Bei der Behandlung der HE steht die Verbesserung der neurologischen und kognitiven Situation des Patienten im Vordergrund. Da erhöhte Ammoniakspiegel im Blut bei einem Großteil der Patienten mit HE vorliegen (80%), zielen viele Therapiekonzepte auf eine Reduktion des Ammoniaks entweder im Gastrointestinaltrakt oder im Blut ab.

1.1.4.1 Therapie auslösender Faktoren

Bevor eine Therapie eingeleitet wird sollte geprüft werden ob Faktoren, die die HE triggern oder verschlimmern, beim Patienten vorliegen und diese zunächst behandelt werden. Hierzu zählen beispielsweise Obstipation, Infektionen, gastrointestinale Blutungen, Exsikkose, Elektrolytverschiebungen wie Hyperkaliämie oder die Einnahme von Sedativa.

1.1.4.2 Diät

Zirrhose-Patienten mit HE wird häufig eine proteinarme Diät empfohlen, um die Neubildung von Ammoniak zu reduzieren. In einer randomisierten Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass eine eingeschränkte Proteinzufuhr keine Verbesserung oder Sanierung der HE bewirkt, sondern sogar durch eine Mangelernährung die Situation verschlechtern kann (Cordoba et al. 2004). Da die Patienten häufig bereits in einem schlechten Ernährungszustand sind, wird durch eine zusätzliche Proteinrestriktion eine katabole Situation mit Abbau körpereigener Proteine begünstigt. Eine Ernährung mit etwa 1-1,5 g Protein pro kg Körpergewicht pro Tag wird als unbedenklich beschrieben für Patienten mit HE (Amodio et al. 2013).

Für weitere diätetische Ansätze wie die Einnahme von Probiotika wurde eine Senkung der Ammoniakspiegel beschrieben, sowie eine subjektive Verbesserung der Lebensqualität der Patienten (Dalal et al. 2017; Lunia et al. 2014). In Bezug auf die Mortalität konnte zwischen Probiotika und Placebo jedoch kein Unterschied gezeigt werden (Dalal et al. 2017). Es wird jedoch diskutiert, ob die regelmäßige Einnahme von Probiotika bei Patienten mit minimaler HE das Fortschreiten in eine manifeste HE hinauszögern kann (Lunia et al. 2014).

1.1.4.3 Nichtresorbierbare Disaccharide zur Reduktion der intestinalen Ammoniakproduktion und –absorption

Laktulose ist ein synthetisches Disaccharid aus D-Galactose und Fructose. Es wird im menschlichen Intestinaltrakt nicht resorbiert und verbleibt somit im Darmlumen. Hier wird Laktulose von der bakteriellen Darmflora gespalten, es entsteht Milchsäure. Dies führt zu einer Ansäuerung im Dickdarmlumen. Durch das Absinken des pH-Wertes verschiebt sich das intestinale Gleichgewicht zwischen Ammoniak (NH_3) und Ammonium (NH_4^+) zugunsten von Ammonium-Ionen, welche schwerer resorbierbar sind. Zudem hemmt das saure Milieu Ammoniak-produzierende Kolibakterien zugunsten von nicht Ammoniak-produzierenden Laktobakterien. Ein weiteres synthetisches Disaccharid, das wie Laktulose eingesetzt wird, ist Laktitol (aus Galaktose und Sorbitol).

Es konnte gezeigt werden, dass nichtresorbierbare Disaccharide im Vergleich zu Placebo-Präparaten eine Senkung des Ammoniakspiegels sowie eine Verbesserung der

Patientenleistung in psychometrischen Tests bewirken (Prasad et al. 2007), nicht jedoch die Mortalität reduzieren (Als-Nielsen et al. 2004).

Häufige Nebenwirkungen dieser Wirkstoffe sind aufgrund der osmotischen Wirksamkeit gastrointestinale Beschwerden, Durchfälle und Flatulenzen.

1.1.4.4 Antibiotika zur Reduktion der intestinalen Ammoniakproduktion

Einige orale Antibiotika hemmen die Population Urease-bildender Bakterien im Dickdarm und führen darüber zu einer Abnahme der intestinalen Ammoniakproduktion und Resorption. Rifaximin ist ein orales Breitspektrumantibiotikum, das zu >99% im Darmlumen verbleibt und damit lokal eine große Wirkstoffkonzentration erreicht. Rifaximin wird ergänzend zur Therapie mit Laktulose eingesetzt oder als Monotherapie bei Unverträglichkeiten gegen Disaccharide. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Rifaximin gegenüber einer Placebo-Behandlung die Hospitalisierungsrate und das Auftreten HE-abhängiger Komplikationen, wie Spontan Bakterielle Peritonitis oder gastrointestinale Blutungen, verringert. Dies wurde durch reduzierte Ammoniakspiegel, EEG-Auswertungen und neuropsychologische Tests belegt (Eltawil et al. 2012; Mas et al. 2003).

In weiteren Studien wurde der Vorteil einer Kombinationstherapie mit Rifaximin plus Laktulose im Vergleich zu Monotherapien mit Laktulose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Laktulose mit einer signifikant kürzeren Hospitalisierungsdauer und signifikant niedrigerer Mortalitätsrate assoziiert ist, was die Autoren auf eine Reduktion des Sepsis-Risikos durch Rifaximin zurückführen (Sharma et al. 2013).

Häufig werden auch andere antimikrobielle Substanzen ergänzend zu nichtabsorbierbaren Disacchariden zur Therapie der HE eingesetzt, z.B. Neomycin, Metronidazol oder Vancomycin (NeSmith et al. 2016), um eine Reduktion der intestinalen Ammoniakproduktion durch Bakterien und eine verminderte Bildung bakterieller Neurotoxine zu erzielen. Zusammengefasst gibt es jedoch nur geringe Evidenz zum Nutzen der genannten Wirkstoffe. Zudem müssen nicht unerhebliche Nebenwirkungen bedacht werden, Neomycin wirkt oto- und nephrotoxisch, Metronidazol kann zu einer peripheren Neuropathie führen.

1.1.4.5 L-Ornithin-L-Aspartat

L-Ornithin-L-Aspartat ist das stabile Salz der zwei körpereigenen nicht essenziellen Aminosäuren Ornithin und Aspartat. Die Wirkung in der Therapie der HE besteht in einer Bindung und damit Reduktion von Ammoniak über eine Verstärkung des Harnstoffzyklus bzw. der Glutaminsynthese. Im gesunden Stoffwechsel mit ausgeglichener Ernährung werden L-Ornithin und L-Aspartat in ausreichender Menge neu synthetisiert. Im Zustand chronischer Erkrankung, Organschädigung oder bei Enzymdefekten des Harnstoffzyklus kann eine zusätzliche Substitution dieser Aminosäuren notwendig werden (Sikorska et al. 2010).

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass eine Therapie mit L-Ornithin-L-Aspartat bei Patienten mit manifester und minimaler HE Ammoniakspiegel im Blut reduzieren und das Abschneiden bei psychometrischen Tests verbessern kann (Abid et al. 2011; Butterworth et al. 2018; Schmid et al. 2010). Ebenso wird ein positiver Einfluss auf die Mortalität im Vergleich zu Placebo oder keiner Intervention beschrieben. Um diese Ergebnisse zu festigen, werden jedoch weitere Daten benötigt (Goh et al. 2018). L-Ornithin-L-Aspartat ist sowohl enteral als auch parenteral verfügbar.

1.1.4.6 Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt (TIPS)

Eine therapeutische Option für Patienten mit chronischer HE stellt die Ligatur portocavaler Anastomosen oder die Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS) dar. Hierbei wird der bestehende portale Hochdruck über eine künstliche Verbindung zwischen Pfortadersystem und ableitenden Lebervenen abgebaut. Jedoch ist bei dieser Methode das Risiko starker Blutung oder einer Verschlechterung der Leberfunktion abzuwägen (Laleman et al. 2013).

1.1.4.7 Chirurgische Therapie

Die einzige kurative Therapie der HE besteht in einer Lebertransplantation. Aufgrund der hohen Wartezeiten sollten in Frage kommende Patienten frühzeitig auf die Transplantationsliste gesetzt werden.

1.2 Inflammation

Der Begriff Inflammation beschreibt eine körpereigene Reaktion auf schädigende Reize. Es kommt u.a. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu einer

gesteigerten Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Zytokine werden insbesondere von Immunzellen, wie Makrophagen, gebildet und vermitteln Entzündungsprozesse. Hierzu gehören z.B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), welche, in großer Menge produziert, eine Sepsis induzieren können, die mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet ist. Zu den klinischen Diagnosekriterien einer Sepsis zählen neben Tachypnoe (Atemfrequenz \geq 22/min) und Hypotonie (Blutdruck systolisch \leq 100mmHg) auch Bewusstseinsveränderung (GCS $<$ 15) (Singer et al. 2016). Damit beeinflussen Inflammation und Entzündungsprozesse den mentalen Zustand der Patienten erheblich. Bis zu 70% der Patienten mit einer nachgewiesenen Bakteriämie entwickeln neurologische Symptome, sodass sich der Begriff „Sepsis-assoziierte Enzephalopathie“ prägte (Wilson und Young 2003).

1.2.1 Inflammation bei der hepatischen Enzephalopathie

Im Serum von Patienten mit Leberschädigung durch Hepatitis oder Leberzirrhose wurden erhöhte IL-6- und TNF- α -Serumspiegel nachgewiesen werden (Genesca und Buti 2004; Nagaki et al. 2000).

In einer Studie von Shawcross et. al (Shawcross et al. 2004) wurde der Einfluss einer Infektion auf Ammoniakspiegel im Gehirn untersucht. Bei Zirrhose-Patienten ohne klinische Zeichen einer HE, aber mit einem SIRS, war eine Hyperammonämie nachweisbar. 24-36 Stunden nach Beginn einer antibiotischen Therapie sowie eine Woche nach Behandlung wurden neuropsychologische Tests durchgeführt. Die Behandlung der Infektion senkte die Plasmaspiegel *pro*-inflammatorischer Zytokine und verbesserte das Abschneiden der Patienten in den neuropsychologischen Tests. Diese Daten lassen vermuten, dass Ammoniak und eine Infektion synergistisch zerebrale Funktionen beeinträchtigen (Shawcross et al. 2010). Bereits in früheren Arbeiten wurde ein synergistischer Effekt von Ammoniak und bakteriellen Stoffwechselprodukten im Darm bei der Entstehung eines hepatischen Komas beschrieben (Zieve et al. 1974).

1.3 Astrozyten

1.3.1 Funktionen

Astrozyten gehören zu den Gliazellen und finden sich im Gehirn und im Rückenmark. Sie machen etwa 50% der Zellmasse des Gehirns aus und sind unter anderem an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Janzer und Raff 1987). Astrozyten sind die einzigen Zellen im Gehirn, die die Glutaminsynthetase exprimieren und damit Ammoniak entgiften können (Norenberg 1979). Je mehr Ammoniak zerebral (aufgrund reduzierter hepatischer Entgiftungsfunktion) anfällt, desto mehr Glutamin wird in den Astrozyten gebildet. Glutamin ist osmotisch wirksam, man geht davon aus, dass die Kumulation von Glutamin in den Astrozyten erheblich zur Entstehung eines geringgradigen zerebralen Ödems beiträgt (Häussinger et al. 2000; Häussinger und Sies 2013).

1.3.2 Bedeutung der Astrozyten für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Astrozyten spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der HE. HE-relevante Faktoren, wie Ammoniak, *pro*-inflammatorische Zytokine, Hyponatriämie oder Benzodiazepine, induzieren alle sowohl eine Astrozytenschwellung als auch oxidativen Stress (Görg et al. 2013; Häussinger und Sies 2013). HE-relevante Faktoren wie Diazepam (Görg et al. 2003) oder *pro*-inflammatorische Zytokine (Chastre et al. 2010; Häussinger und Schliess 2008) wirken synergistisch mit Ammoniak bei der Bildung von oxidativem Stress in Astrozyten. Ebenso wirken Ammoniak und *pro*-inflammatorische Zytokine synergistisch bei der Induktion von osmotischem Stress (Rama Rao et al. 2010) und mitochondrialer Dysfunktion (Alvarez et al. 2011) in Astrozyten. In Folge von osmotischem und oxidativem Stress werden Tyrosin-Reste in Proteinen nitriert (Schliess et al. 2002), RNA wird oxidiert (Görg et al. 2008) und die Genexpression wird moduliert (Kruczek et al. 2011; Kruczek et al. 2009; Oenarto et al. 2016). Es wird vermutet, dass diese Veränderungen die Astrozytenfunktion und die Neurotransmission beeinträchtigen, Netzwerke im Gehirn stören (Butz et al. 2013; Butz et al. 2010; Norenberg 1998) und damit die Symptome der HE auslösen.

1.4 Mikroglia

1.4.1 Funktionen und Formen von Mikroglia

Mikroglia gehören zur Neuroglia, die man im Gehirn sowie im Rückenmark findet (Ginhoux et al. 2013). Ihr Anteil an allen im Gehirn vorkommenden Zellen liegt bei etwa 10-15% (Norenberg 1979). Sie haben viele Gemeinsamkeiten mit Makrophagen und stellen die angeborene Abwehr des zentralen Nervensystems (ZNS) dar (Labzin et al. 2018). Mikroglia können kleinste Veränderungen in ihrem Milieu wahrnehmen. Dies gelingt u.a. durch permanente Überwachung der extrazellulären Konzentration von ATP, Kalium und Glutamat.

Durch die Blut-Hirn-Schranke ist das ZNS normalerweise im Körper zirkulierenden potenziell pathogenen Faktoren nicht direkt ausgesetzt. Falls es doch zu einem direkten Kontakt kommt, müssen Mikroglia schnell reagieren, um einer Schädigung des Nervengewebes entgegen zu wirken. Wie die Makrophagen im übrigen Körper machen auch Mikroglia Pathogene durch Phagozytose unschädlich. Mikroglia sind dabei die Hauptquelle für die Synthese *pro*-inflammatorischer Zytokine im Gehirn (Kraft und Harry 2011).

Die Morphologie von Mikroglia ist sehr plastisch und vielfältig. In Abhängigkeit ihres Aktivierungszustands werden Mikroglia in Klassen eingeteilt: ramifizierte („ruhende“), aktivierte und reaktive Mikroglia (Ling und Wong 1993).

Ramifizierte, nicht aktivierte Mikroglia erfassen pathogene Reize in ihrer Umgebung, sie verändern dabei ihre Genexpression und Oberflächenmarker abhängig von den jeweiligen Begebenheiten. Im Gegensatz zu anderen Makrophagen präsentieren Mikroglia in ihrem „Ruhezustand“ keine MHC I/II- Proteine, CD45 oder andere Oberflächen-Rezeptoren (Aloisi 2001). Sie weisen einen kleinen Zellkörper und lange Ausläufer auf, die ständig in Bewegung sind (Norenberg 1979). Obwohl sie als ruhend bezeichnet werden, sind Mikroglia dennoch sehr aktiv und können zu jeder Zeit in die „aktivierte“ Form übergehen. Sobald Mikroglia aktiviert werden nehmen sie eine amöboide Form ein und verändern ihre Genexpression im Hinblick auf die Synthese *pro*-inflammatorischer Mediatoren (Häussinger et al. 2000).

Klassischerweise wurden zwei Phänotypen aktivierter Mikroglia unterschieden: der *pro*-inflammatorische M1-Phänotyp triggert über die Synthese *pro*-inflammatorischer

Zytokine (IL-6, TNF- α , IL-1 β) eine Entzündungsreaktion am Ort der Schädigung. Es kommt zu einer verstärkten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, welche wiederum die Einwanderung peripherer Immunzellen ermöglicht (Lu et al. 2001). Der *anti*-inflammatorische M2-Phänotyp fördert Angiogenese und den Gewebeumbau sowie Reparaturmechanismen (Fumagalli et al. 2011). Tatsächlich geht man davon aus, dass innerhalb dieser beiden Klassen noch viele weitere Unterklassen existieren.

1.4.2 Bedeutung der Mikroglia für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Die Rolle der Mikroglia in der Entstehung der HE ist noch nicht gänzlich geklärt. Es zeigt sich eine Aktivierung von Mikroglia im Gehirn von Tiermodellen für akutes (Butterworth 2011; Jiang et al. 2009a; Jiang et al. 2009b) und chronisches Leberversagen (Hernandez-Rabaza et al. 2015; Hernandez-Rabaza et al. 2016). Allerdings legen Daten von mit Ammoniak behandelter Mikroglia (Andersson et al. 2005; Zemtsova et al. 2011) sowie Daten aus *post mortem* Hirngewebe-Proben von Zirrhose-Patienten mit HE (Görg et al. 2013; Zemtsova et al. 2011) nahe, dass diese Mikroglia zwar aktiviert aber nicht reaktiv sind. Die Aussage wird bekräftigt durch die verstärkte Expression von Mikrogliaaktivierungsmarkern wie dem *ionized calcium-binding adaptor* (IBA) 1 oder dem *cluster of differentitaion* (CD) 14 im Gehirn, jedoch nicht von *pro*-inflammatorischen Zytokinen (Görg et al. 2013; Zemtsova et al. 2011). Eine aktuelle Transkriptom-Analyse aus *post mortem* Hirnproben von Zirrhose-Patienten mit HE weist sogar auf eine Hochregulation von Markern *anti*-inflammatorischer Makrophagen vom Phänotyp M2 und auf eine Aktivierung *anti*-inflammatorischer Signalwege hin (Görg et al. 2013).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die oben beschriebenen Beobachtungen führen zu der Frage, ob Ammoniak einen *pro*- oder *anti*-inflammatorischen Effekt auf Mikroglia ausübt und hierüber zerebral inflammatorische Prozesse beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Ammoniak auf die Lipopolysaccharid- (LPS) induzierte Hochregulation von Mikrogliaaktivierungsmarkern und Zytokin-mRNA, isoliert aus mono-kultivierter Mikroglia oder aus Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen, überprüft. Es sollten dabei Effekte von Ammoniak auf die Transkription und Freisetzung von *pro*-

inflammatorischen Faktoren untersucht werden und es sollte überprüft werden, welchen Einfluss Ammoniak auf die Transkription von Mikroglia-Aktivierungsmarkern hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Allopregnanolon	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
BDNF	Merck, Darmstadt, Deutschland
CY3-Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	PAA, Linz, Deutschland
GlutaMAX™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hoechst34580	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Immersionsöl	Zeiss, Jena, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

LPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS (mit/ ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penizillin/Streptomycin	Cytogen, Sinn, Deutschland
Phalloidin, FITC-markiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
SYBR Green	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taurolithocholsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
TGR5-Antikörper	In Auftrag gegeben von Prof. Dr. med. V. Keitel
TNF α	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05%/ 0,02% in PBS)	Cytogen, Sinn-Fleisbach, Deutschland

2.1.2 Molekularbiologische Kits

Name Kit	Hersteller
Milliplex Map Magnetic Bead Kit "Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel"	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
QuantiTect [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAse-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Spezielle Materialien und Geräte

Material	Hersteller
24-Wellplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cell Strainer, 70µM Nylon	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser für die Mikroskopie	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspritze (1ml, 20ml, 50ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegküvetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Glaspipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Ibidi-Schale (Ø35mm, Plastik, Glas)	Ibidi, Planegg, Deutschland
MatTek-Schale (Ø55mm, Plastik, Glas)	MatTek Corporation, Ashland, USA
Nitrocellulose Transfer Membran Protran®	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger für die Mikroskopie	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
QIAshredder Säulen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße (Safe lock)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen (Greiner, 14ml, 50ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (Filtropur, 0,20µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Stripetten (5, 10, 25ml)	Corning Costar GmbH, Bodenheim
Whatman Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Zellkulturflasche (cellstar)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturschalen (Ø60mm, Ø100mm)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Corning Costar GmbH, Bodenheim
Zentrifugationsröhrchen (Ø13x51mm, Plastik)	Beckman, Krefeld, Deutschland

Geräte	Hersteller
Analysenwaage (Kern 770)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Brutschrank (Heracell150)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cell Observer (Z1)	Zeiss, Jena, Deutschland
Konfokales Laserscanning Mikroskop (LSM510META)	Zeiss, Jena, Deutschland
Magnetrührer (MR 2000)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Nanodrop (1000 Spectrophotometer)	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
pH-Meter (330)	WTW, Weilheim, Deutschland
Präzisionswaage Kern (440-47N)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Realtime-PCR (ABI 7500)	Applied Biosystems, Carlsbad, California
Realtime-PCR (ViiA7)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Roller (SRT1)	Stuart Scientific, Staffordshire, USA
Schlauchpumpe (505 S)	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Schüttler (GFL-3017)	Hilab, Düsseldorf, Deutschland
Spektrophotometer (Ultrospec 2100 pro)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

Ultrazentrifuge (J2-HS)	Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.4 Primer für die quantitative Realtime-PCR

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Realtime-PCR Primer

Target cDNA	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
CD14	GCTGTTGCCTTTGACACTGG	CGCATAGAAAAGCGCTGGAC
HPRT1	TGCTCGAGATGTCATGAAGGA	CAGAGGGCCACAATGTGATG
IBA1	GATGACCTGGAGGCCATAGC	TCTGGGTTGGATGGTCTCTTC
IL-1 α	GATGACCTGGAGGCCATAGC	TCTGGGTTGGATGGTCTCTTC
IL-1 β	AGACAGCTGCACTGCAGGCT	CAGCACGAGGCATTTTTGTT
IL-6	AGACTTCCAGCCAGTTGCCT	GGCAGTGGCTGTCAACAACA
IL-10	GTTGCCAAGCCTTGTCAGAAA	TTTCTGGCCATGGTTCTCT
IL-12A	CACTCCCATTCCTACTTCTC	AACGCACCTTTCTGGTTA
IL-12B	TCCTCCTAAACCACCTCACTT	TTTTCTCTGGCCGTCTCAC
TGF- β_1 ¹	TGGCGTTACCTTGTAACC	GGTGTTGAGCCCTTTCCAG
TGF- β_2 ¹	ATCGATGGCACCTCCACATATG	GCGAAGGCAGCAATTATGCTG
TGF- β_3 ¹	AAGCGCACAGAGCAGAGAGAATC	AGTGTCAGTGACATCGAAG
TLR-4	GAGGACTGGGTGAGAAACGA	GAAACTGCCATGTCTGAGCA
TNF- α	TGATCGGTCCCAACAAGGAG	TGATGAGAGGGAGCCCATT

¹ (Wickert et al. 2002)

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation, Kultivierung und experimentelle Handhabung von Astrozyten und Mikroglia aus dem Rattenkortex

2.2.1.1 Präparation und Kultivierung der Zellen

Für die Präparation primärer Astrozyten und Mikroglia wurden neugeborene Wistarratten verwendet (Matthiessen et al. 1989). Die Tiere wurden dekapitiert, die beiden Großhirnhemisphären wurden isoliert, das gewonnene Material wurde trypsinisiert und in Zellkultur-Flaschen in 10ml DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Penizillin/Streptomycin kultiviert. Nachdem die gemischten Gliazellen für 14 Tage kultiviert wurden, wurden die Mikroglia von den Astrozyten getrennt durch Schütteln auf der Schüttelplatte bei 200 Umdrehungen pro Minute bei 37°C für 24 Stunden. Die abgelösten Mikroglia wurden in einer Zählkammer mikroskopiert, um die Zelldichte zu bestimmen. Sie wurden dann mit einer Zelldichte von $2,1-2,5 \times 10^6$ Zellen auf eine 60mm Petrischale ausgesät und für 30min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt um Zellen, die nicht angewachsen waren, zu entfernen. Die Astrozyten wurden für 4-6 Wochen kultiviert und die Zelldichte mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops regelmäßig geprüft bevor Experimente durchgeführt wurden. Kokulturen wurden geschaffen, indem $2,1-2,5 \times 10^6$ Mikroglia auf eine konfluente Schicht Astrozyten auf einer 60mm Petrischale ausgesät wurden. Alle Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit GlutaMAX™ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 10% FCS (PAA, Linz, Deutschland) in angefeuchteter Luft bei 37°C und 5% CO₂ (Schliess et al. 2002; Zemtsova et al. 2011).

Die Präparation der Zellen wurde von Frau Ursula Kristek durchgeführt (Organentnahmenummer ZETT: 078/08).

2.2.1.2 Experimentelle Behandlung der Zellen

30min vor jedem Experiment wurde das Medium der Hunger-Zellkultur abgesaugt und durch DMEM ohne FCS ersetzt. Für die experimentelle Behandlung wurden NH₄Cl (5mmol/l) und/oder LPS (100ng/ml) dem Zellkultur-Medium hinzugefügt und die Zellen nachfolgend für 18h inkubiert bei 37°C und 5% CO₂. Nach 18h Inkubation wurden die Zellkultur-Überstände gesammelt und Zellüberreste wurden durch

Zentrifugation bei 20000xg für 10min bei 4°C entfernt. Die Zellkultur-Überstände wurden bei -80°C gelagert.

Die Zellen wurden dreifach mit eiskaltem *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) gewaschen und nach Angaben des Herstellers mittels des RNA Lyse Puffers (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert.

Ein Teil der Proben wurde nach oben beschriebenem Vorgehen freundlicherweise von Frau Aygul Shafigullina generiert.

2.2.2 Realtime- PCR

2.2.2.1 Prinzip

Bei der quantitativen *Polymerase Chain Reaction* (qPCR) handelt es sich um eine Methode, mittels derer bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert und quantifiziert werden können. In dieser Arbeit wurde die Amplifikationsrate mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* gemessen. Dieser Farbstoff bindet nach Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda=494\text{nm}$ an doppelsträngige DNA und fluoresziert dadurch. Nach jedem Amplifikationszyklus wird das Fluoreszenzsignal des *SYBR Green* Farbstoffs bestimmt, wobei der Anstieg des Signals proportional ist zur Menge der DNA-Amplifikate (Heid et al. 1996). Die Quantifizierung der DNA-Amplifikate erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR, da die Produktmenge hier in jedem Zellzyklus verdoppelt wird.

Die Schwellenwerte der Amplifikation wurden automatisiert von der ABI Software SDS Version 1.4 Patch 2 ermittelt und für die Berechnung relativer Genexpressionsänderungen durch die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001).

2.2.2.2 Durchführung

Die RNA-Isolation aus mono-kultivierter Mikroglia bzw. aus Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden die Zellen dreimalig mit eiskaltem PBS gewaschen bevor sie lysiert und die RNA mithilfe der entsprechenden Komponenten des Kits extrahiert wurde. Die extrahierte RNA wurde anschließend mittels des Nanodrop1000 Systems (Thermo Scientific, Wilmington, USA) durch Messung der

Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ quantifiziert. Die Messung wurde für jede Probe doppelt durchgeführt. Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte mit dem *First Strand cDNA-Synthesis-Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde jeweils $1\mu\text{g}$ RNA eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde dann in die PCR eingesetzt. Die Durchführung der *Realtime-PCR* erfolgte am ABI 7500 und am ViiA7 (Applied Biosystems/Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland) unter Verwendung eines PCR Standard-Mixes (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung Standard-Mix PCR

Komponente	Volumen (μl)
cDNA (1:6 verdünnt, $10\text{ng}/\mu\text{l}$)	1,2
Primer forward ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)	1,0
Primer reverse ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)	1,0
2 x SYBR Green	12,5
Nuklease-freies Wasser	9,3
Gesamtvolumen	25

Aus dem so entstandenen Reaktionsansatz wurden in eine 96-Well Reaktionsplatte (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) pro Well $25\mu\text{l}$ pipettiert. Der Spiegel jedes untersuchten Gens wurde im Duplikat gemessen. Nachfolgend wurde die 96-Well Reaktionsplatte mit einer Folie versiegelt und die *Realtime-PCR* im ABI 7500 Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) bzw. im ViiA7 (Thermo Fischer Scientific) mit der präparierten 96-Well Reaktionsplatte unter den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 6: Geräteeinstellungen Realtime-PCR

RT-PCR			
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	50	2 Minuten	} 40
Denaturierung	95	10 Minuten	
Annealing	95	15 Sekunden	
Elongation	60	1 Minuten	

Am Ende der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zwischen den korrekten Produkten und Artefakten (wie z.B. Primerdimere) differenzieren zu können. Dabei lösen sich die Helices der doppelsträngigen DNA durch langsames Erhitzen (schmelzen). Währenddessen wird die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Das „Schmelzen“ beruht auf einer Denaturierung des DNA-Doppelstranges, die charakteristisch für das Amplifikat ist und eine spezifische Schmelztemperatur aufweist. Dabei dissoziiert der Fluoreszenzfarbstoff von der DNA und es kommt zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität. Ist die PCR erfolgreich und spezifisch verlaufen, wird ein einzelner Peak erkennbar, der die Synthese eines spezifischen Produktes anzeigt. Die relative Quantifizierung der Amplifikate wurde mittels Delta-Delta-C_t ($\Delta\Delta C_t$) Methode durchgeführt (Livak und Schmittgen 2001). Hierbei wurde die Expression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes *Housekeeping-Gen* (HPRT) bezogen. Aus den Delta C_t (ΔC_t) Werten beider Gruppen wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert und der Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen durch die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ermittelt.

Teile dieser Untersuchungen wurden von Frau Ayse Karababa durchgeführt.

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Behandlung} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Abbildung 7: Delta-Delta-Ct ($\Delta\Delta C_t$) -Methode zur relativen Quantifizierung.

2.2.3 Quantifizierung der Zytokinmenge in Zellkulturüberständen

2.2.3.1 Prinzip

Die Messung der Zytokin-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen der monokultivierter Mikroglia und in den mit Astrozyten ko-kultivierten Mikroglia wurde mit dem Luminex 200 System (Luminex, Austin, USA) durchgeführt.

Grundlage der Technologie sind Mikropartikel aus Polystyrol (Beads), die mit unterschiedlichen Nachweisreagenzien (z.B. Antikörper, Antigene, Enzyme) beladen werden. Sie unterscheiden sich durch eine spezifische intrinsische Fluoreszenz. Die Bindung der Analyte an die Beads erfolgt über einen spezifischen Antikörper. Dieser ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Identifizierung der Beads und die Quantifizierung der gebundenen Analyten erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Hierbei werden die Beads in einem Flüssigkeitsstrom aufgereiht und mit zwei verschiedenen Lasern gleichzeitig angeregt. Ein Laser regt die intrinsische Bead-Fluoreszenz an, der andere die fluoreszenzmarkierten Antikörper. Über diese Technik können in einer Probe bis zu 100 unterschiedliche Analyte quantifiziert werden.

2.2.3.2 Durchführung

Für die Zytokin-Bestimmung wurde das *Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* verwendet. Vor den Messungen wurde das Luminex 200 Gerät kalibriert mit Hilfe des *xPonent 3.1 Calibration Kit* (Millipore, Darmstadt, Deutschland). Die Zytokin- und Chemokin Immunoassays sowie das Waschen der Beads (mit ELx405, Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland) wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Diese Versuche wurden von Frau Ute Albrecht und Herrn Torsten Janssen durchgeführt.

2.2.4 Immunfluoreszenzanalyse

2.2.4.1 Prinzip

Um den TGR5-Rezeptor in Zellen nachzuweisen wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Markierung eines Antigens eines spezifischen Proteins mittels eines Antikörpers. An diese primären Antikörper bindet nachfolgend ein Fluochrom-markierter sekundärer Antikörper. Durch Licht einer spezifischen Wellenlänge werden die Elektronen des Fluochroms angeregt. Hierdurch

werden Photonen freigesetzt, diese können als „Fluoreszenz“ detektiert und abgebildet werden.

2.2.4.2 Durchführung

Kultivierte Rattenmikroglia wurden mit 100% Methanol (-20°C) für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (TGR5, 1:250) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der polyklonale Primärantikörper gegen TGR5 wurde in Meerschweinchen hergestellt (Kramp4, Prof. Dr. med. Verena Keitel). Nach Inkubation wurden die Zellen dreimalig mit PBS (+Mg²⁺/+Ca²⁺) gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (CY3) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Anfärbung der Kerne wurde Hoechst34580 (1:5000), zur Anfärbung von Aktin wurde Phalloidin (1:200) der Sekundärantikörper-Lösung zugegeben. Nach Inkubation wurden die Zellen erneut dreimalig mit PBS (+Mg²⁺/+Ca²⁺) gewaschen. Die Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM510META) von Zeiss in 630-facher Vergrößerung (Keitel et al. 2010).

Diese Untersuchungen wurden von Frau Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino durchgeführt.

2.3 Statistik

Jedes Experiment wurde mit Zellen von mindestens 3 unabhängigen Präparationen/Aussaaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter, zweiseitiger T-Test nach Student durchgeführt (Microsoft, Redmont, USA), oder beim Vergleich von mehr als zwei Experimentalgruppen der one-way ANOVA (analysis of variance, GraphPad Prism; GraphPad, La Jolla, USA) angewendet. Dabei wurde ein p-Wert ≤ 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von NH₄Cl auf die mRNA Expression von Zytokinen und Mikrogliaaktivierungsmarkern in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen

Mono-kultivierte Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurden mit NH₄Cl (5mmol/l) für 18h inkubiert. Anschließend wurden die mRNA geerntet und die mRNA-Spiegel der Zytokine IL-1 α / β , IL-6, IL-10, IL-12 α / β , TNF- α , TGF- β ₁₋₃, der Mikrogliaaktivierungsmarker CD14 und IBA1 sowie des LPS-Rezeptors TLR-4 mittels *Realtime*-PCR quantifiziert.

Wie in Abbildung 8A dargestellt, blieben in der Mikroglia-Monokultur die mRNA-Spiegel der *pro*-inflammatorischen Zytokine IL-1 α / β und TNF- α unter dem Einfluss von NH₄Cl (Inkubation mit 5mmol/l, für 18h) unverändert. Die mRNA-Spiegel von IL-6 und IL-10 sanken tendenziell und die mRNA-Spiegel von IL-12 β und TGF- β ₂₋₃ wurden durch NH₄Cl signifikant herunterreguliert im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. In Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen veränderten sich die mRNA-Spiegel von IL-1 α / β , IL-6, IL-10, IL-12A/B, TNF- α und TGF- β ₁₋₃ durch Inkubation mit NH₄Cl nicht signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 8B).

Die mRNA Expression des Mikrogliaaktivierungsmarkers IBA1 sank signifikant in mono-kultivierter Mikroglia jedoch nicht in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen nach Inkubation mit NH₄Cl (5mmol/l) für 18h. Die Expression des Mikrogliaaktivierungsmarkers CD14 und des LPS-Rezeptors TLR-4 blieben unter NH₄Cl-Exposition unverändert sowohl in mono-kultivierter Mikroglia als auch in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (Abbildung 8C).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ammoniak die Transkription von IL-12 β und TGF- β ₂₋₃ sowie die des Mikrogliaaktivierungsmarkers IBA1 herunterreguliert in mono-kultivierter Mikroglia, aber nicht in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen. Auf die Expression des Mikrogliaaktivierungsmarkers CD14 und des LPS-Rezeptors TLR-4 hatte Ammoniak keinen Einfluss, weder in mono-kultivierter Mikroglia noch in den Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.

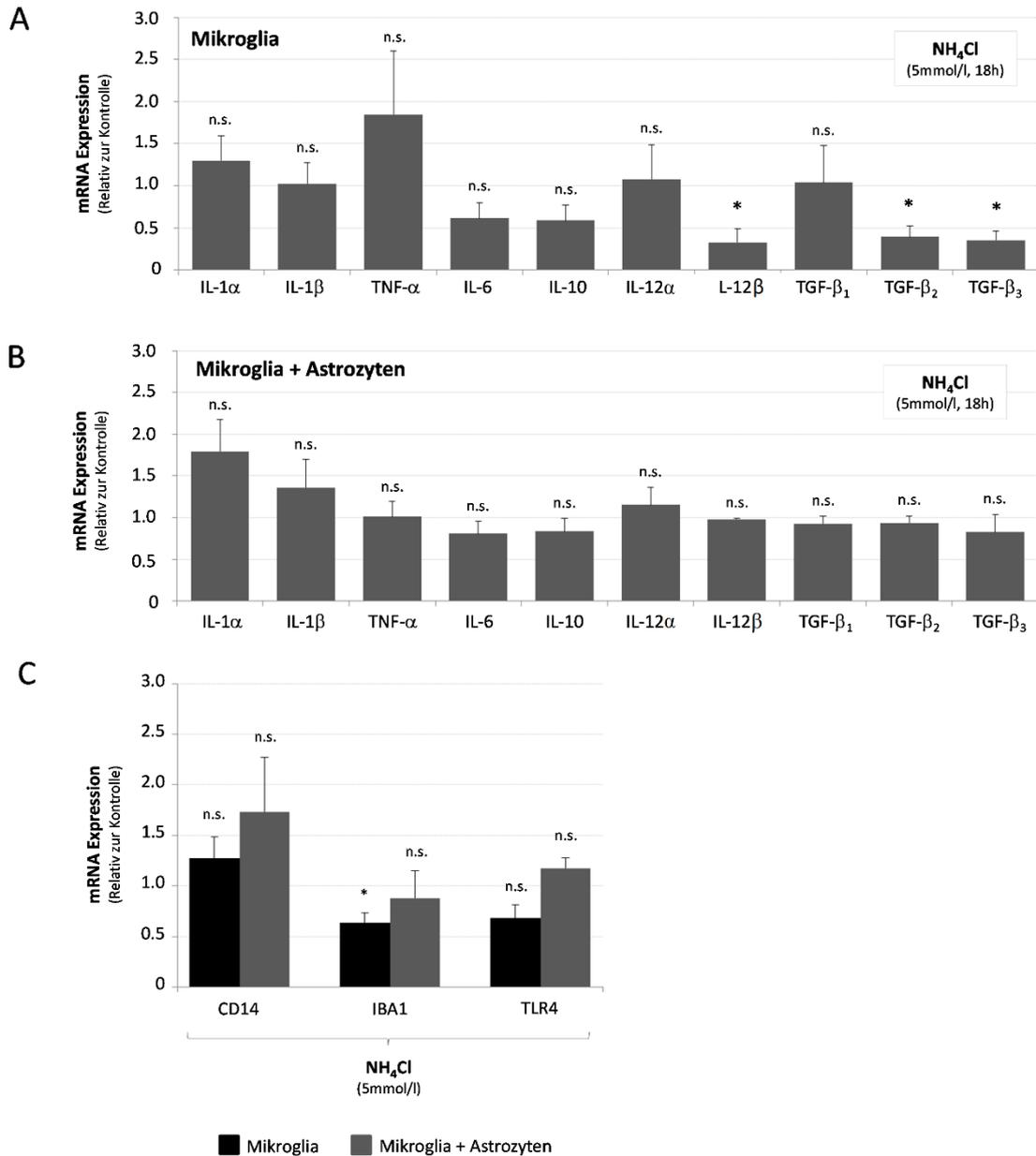


Abbildung 8: Effekte von NH_4Cl auf die Expression von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und des LPS-Rezeptors TLR4 in mono-kultivierter Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen. Mono-kultivierte Ratten-Mikroglia (A, C) oder Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (B, C) wurden für 18 Stunden mit NH_4Cl (5mmol/l) stimuliert. Die mRNA Expressionsspiegel für Zytokine (A, B), CD14, IBA1 und TLR4 (C) wurden mittel Realtime-PCR quantifiziert und in Relation zu den unbehandelten Kontrollen ausgedrückt. Dabei wurde die mRNA der Zielgene jeder Probe auf das entsprechende Expressionsniveau des *Housekeeping Gens* HPRT1 normiert. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen. Daten von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.

Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag: Springer Nature; Neurochemical Research; Ammonia attenuates LPS-induced upregulation of pro-inflammatory cytokine mRNA in co-cultured astrocytes and microglia; Karababa, Groos-Sahr et al.; Copyright © 2016, Springer Nature; die Abbildungen wurden übersetzt.

3.2 Effekte von LPS auf die mRNA Expression von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und TLR-4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen

Mono-kultivierte Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurden mit LPS (100ng/ml) für 18h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die mRNA-Spiegel der Zytokine IL-1 α / β , IL-6, IL-10, IL-12A/B, TNF- α , TGF- β ₁₋₃, der Mikrogliaaktivierungsmarker CD14 und IBA1 und des LPS-Rezeptors TLR-4 mittels *Realtime*-PCR quantifiziert.

Sowohl in der Monokultur als auch in der Kokultur steigerte die Inkubation mit LPS die mRNA Expression von IL-1 α / β , IL-6, IL-10, IL-12 β und TNF- α um zum Teil mehr als das Tausendfache im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 9A). In den mit LPS (100ng/ml, 18h) behandelten Kulturen waren die mRNA-Spiegel von IL-1 α / β , IL-6, IL-12 β und TNF- α in der Kokultur tendenziell oder signifikant niedriger als in der Monokultur (Abbildung 9A). Die mRNA Expression des *anti*-inflammatorischen Zytokins IL-10 wurde sowohl in den mit LPS inkubierten Kokulturen als auch in den mit LPS inkubierten Monokulturen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen hochreguliert, in der Kokultur zeigte sich allerdings eine stärkere Hochregulation als in der Monokultur (Abbildung 9A). Die mRNA Expression des *anti*-inflammatorischen Zytokins TGF- β wurde sowohl in der mit LPS inkubierten Monokultur (TGF- β _{2,3}) als auch in der mit LPS inkubierten Kokultur (TGF β ₁₋₃) herunterreguliert (Abbildung 9B).

Die Inkubation der Zellen mit LPS (100ng/ml, 18h) steigerte ebenfalls die Expression der mRNA des Mikrogliaaktivierungsmarkers CD14 und verringerte die TLR-4-mRNA-Spiegel sowohl in mono-kultivierter Mikroglia als auch in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen. Jedoch waren die CD14-mRNA-Spiegel in der mit LPS inkubierten Kokultur geringer als in der mit LPS inkubierten Monokultur. Gleichzeitig zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der mRNA Expression von IBA1 in den mit LPS inkubierten Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (Abbildung 9C).

Die Ergebnisse zeigen, dass LPS eine deutliche Hochregulation der mRNA Expression von IL-1 α / β , IL-6, IL-10, IL-12 β , TNF- α und CD14 und gleichzeitig eine Herunterregulation der mRNA Expression von TGF- β und TLR-4 sowohl in mono-kultivierter Mikroglia als auch in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen induziert. Die durch LPS induzierten mRNA Expressionsänderungen waren in den Astrozyten/Mikroglia-

Kokulturen im Vergleich zu mono-kultivierter Mikroglia in Bezug auf IL-6, TNF- α und CD14 stärker und für IL-10 schwächer ausgeprägt.

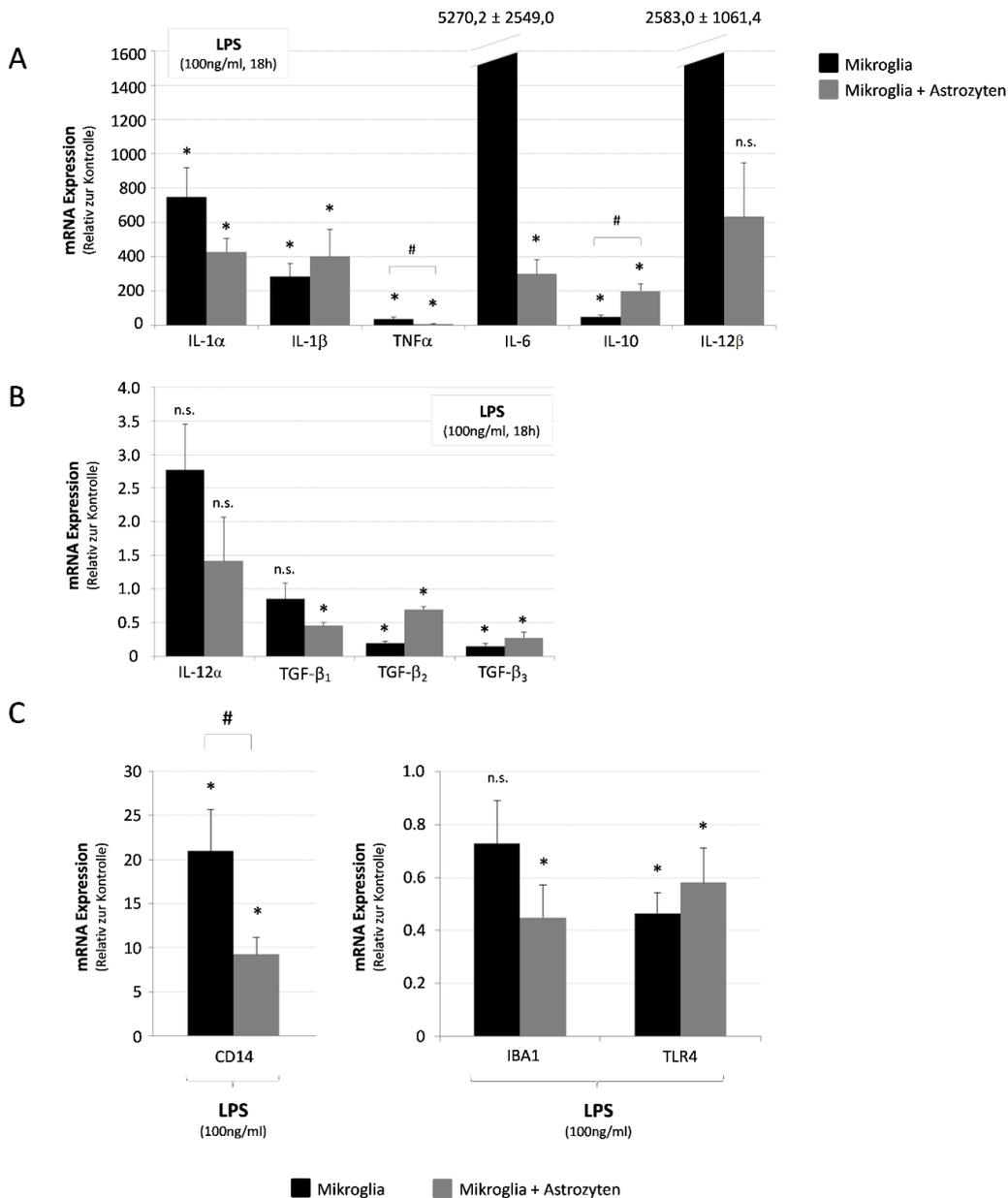


Abbildung 9: Effekt von LPS auf die mRNA Expression von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und des LPS-Rezeptors TLR4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.

Mono-kultivierte Ratten-Mikroglia oder Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurden für 18 Stunden mit LPS (100ng/ml) inkubiert. Die mRNA Expressionsspiegel der Zytokine (A, B), CD14, IBA1 oder TLR4 (C) wurden mittels Realtime-PCR quantifiziert und in Relation zu den unbehandelten Kontrollen ausgedrückt. Dabei wurde die mRNA der Zielgene jeder Probe auf das entsprechende Expressionsniveau des *Housekeeping Gens* HPRT1 normiert. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. # statistisch signifikant unterschiedlich zu LPS-behandelten Mikroglia. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen. Daten von n=3-9 unabhängigen Experimenten.

Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag: Springer Nature; Neurochemical Research; Ammonia attenuates LPS-induced upregulation of pro-inflammatory cytokine mRNA in co-cultured astrocytes and microglia; Karababa, Groos-Sahr et. al; Copyright © 2016, Springer Nature; die Abbildungen wurden übersetzt.

3.3 Effekte von Ammoniak auf LPS-induzierte mRNA Expressionsänderung von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und TLR-4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen

Mono-kultivierte Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurden mit LPS (100ng/ml) für 18h in An- oder Abwesenheit von NH₄Cl (5mmol/l, 18h) inkubiert. Nachfolgend wurde die mRNA isoliert und die mRNA-Spiegel der Zytokine IL-1 α / β , IL-6, IL-10, IL-12 α / β , TNF- α , TGF- β ₁₋₃, der Mikrogliaaktivierungsmarker CD14 und IBA1 und des LPS-Rezeptors TLR-4 mittels *Realtime*-PCR quantifiziert.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, steigerte NH₄Cl (5mmol/l, 18h) die durch LPS (100ng/ml, 18h) induzierte Hochregulation der mRNA von TNF- α in mono-kultivierter Mikroglia. NH₄Cl (5mmol/l, 18h) beeinflusste die mRNA-Spiegel von IL-1 α / β , IL-6, IL-10, IL-12 α / β oder TGF- β ₁₋₃ im Vergleich zu mono-kultivierter Mikroglia, die nur mit LPS (100ng/ml, 18h) inkubiert wurden, nicht (Abbildung 10A).

In Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen verringerte NH₄Cl (5mmol/l, 18h) die durch LPS (100ng/ml, 18h) induzierten Hochregulation der mRNA Expression von IL-1 α / β , IL-6 und TNF- α signifikant. Die mRNA-Spiegel von IL-10, IL-12 α / β und TGF- β ₁₋₃ waren in den mit LPS+NH₄Cl-inkubierten Kokulturen nicht signifikant unterschiedlich zu den mit LPS inkubierten Kokulturen (Abbildung 10B).

Die LPS-induzierte Hochregulation der mRNAs von CD14 und IBA1 wurde durch NH₄Cl (5mmol/l, 18h) in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen, nicht jedoch in mono-kultivierter Mikroglia signifikant verringert (Abbildung 10C).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Ammoniak die LPS-induzierte Expressionssteigerung der mRNA der *pro*-inflammatorischen Zytokine IL-1 α / β , IL-6 und TNF- α sowie der Mikrogliaaktivierungsmarker CD14 und IBA1 in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen, jedoch nicht in mono-kultivierter Mikroglia abschwächt (Abbildung 10).

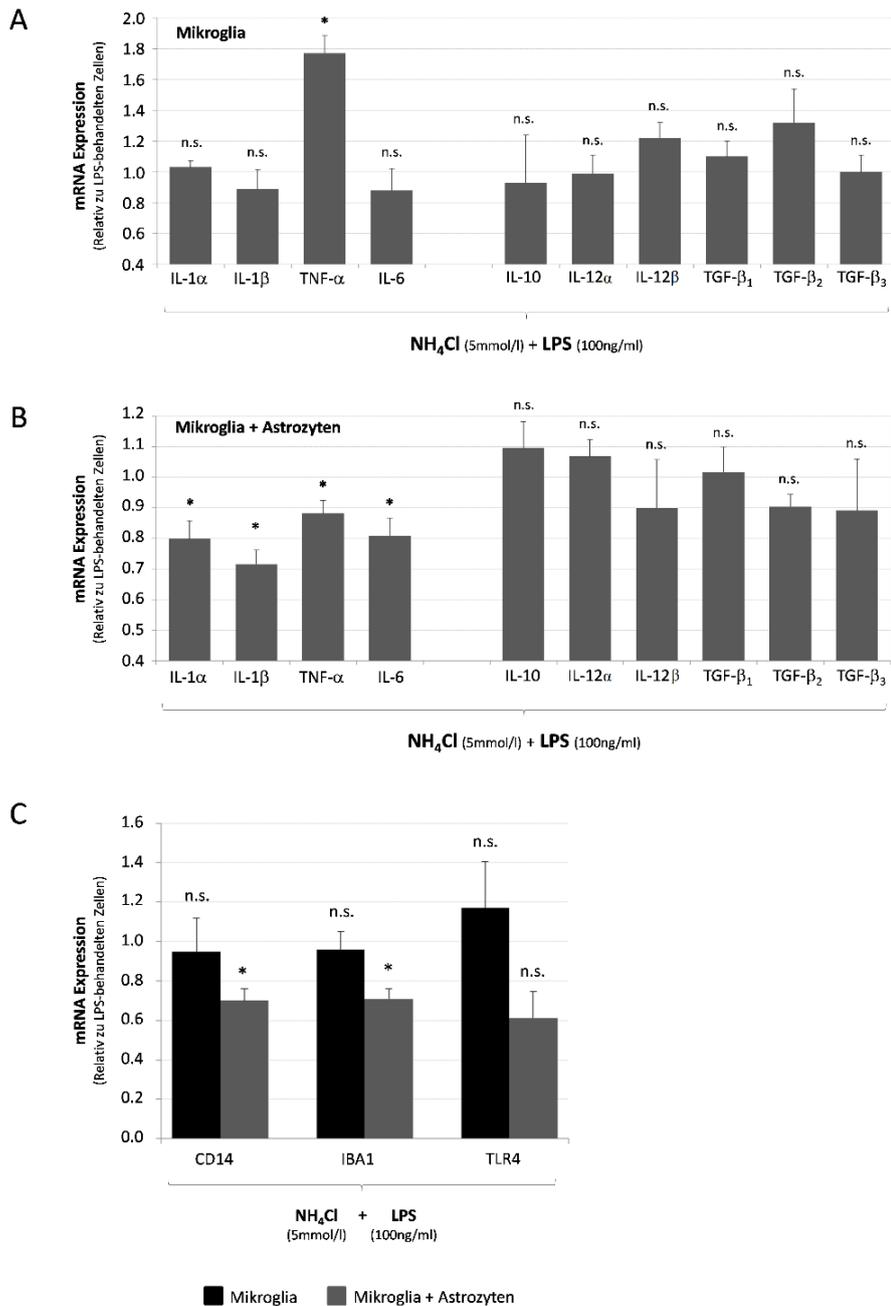


Abbildung 10: Effekte von NH₄Cl auf LPS-vermittelte Expressionsänderungen mRNAs von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und dem LPS-Rezeptor TLR4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.

Mono-kultivierte Mikroglia (A, C) oder Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (B, C) wurden entweder inkubiert mit LPS (100ng/ml), LPS (100ng/ml) + (NH₄Cl (5mmol/l) oder blieben unbehandelt für 18 Stunden. Die mRNA Expressionsspiegel von Zytokinen (A, B), CD14, IBA1 und TLR4 (C) wurden mittels Realtime-PCR quantifiziert und in Relation zu den unbehandelten Kontrollen ausgedrückt. Dabei wurde die mRNA der Zielgene jeder Probe auf das entsprechende Expressionsniveau des *Housekeeping Gens* HPRT1 normiert. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen. Daten von n \geq 3 unabhängigen Experimenten.

Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag; Springer Nature; Neurochemical Research; Ammonia attenuates LPS-induced upregulation of pro-inflammatory cytokine mRNA in co-cultured astrocytes and microglia; Karababa, Groos-Sahr et. al; Copyright © 2016, Springer Nature; die Abbildungen wurden übersetzt.

3.4 Effekte von Ammoniak auf die LPS-induzierte Freisetzung von Zytokinen in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen

Mono-kultivierte Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurden unbehandelt gelassen oder wurden mit NH_4Cl (5mmol/l, 18h), LPS (100ng/ml, 18h) oder LPS (100ng/ml, 18h) + NH_4Cl (5mmol/l, 18h) inkubiert. Die Konzentrationen von IL-1 α/β , IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , MCP-1 und TGF- β_{1-3} wurden in den Zellkultur-Überständen mit Hilfe des *Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panels* und des Luminex® Systems quantifiziert.

Wie in Tabelle 7 und Tabelle 8 gezeigt, veränderte NH_4Cl (5mmol/l, 18h) die Konzentrationen von IL-1 α/β , IL-6, IL-10, TNF- α oder TGF- $\beta_{1, 3}$ weder in den Zellkultur-Überständen in mono-kultivierter Mikroglia noch in denen von Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen. Allerdings verringerte NH_4Cl die Konzentration von TGF- β_2 signifikant im Zellkultur-Überstand von mono-kultivierter Mikroglia (Tabelle 7). Die Inkubation der Zellen mit LPS (100ng/ml, 18h) steigerte die Konzentrationen von IL-1 α/β , IL-6, IL-10, TNF- α und MCP-1 in den Zellkultur-Überständen in jedem unabhängigen Experiment deutlich (Tabelle 7). Jedoch hob sich die LPS-induzierte Zunahme der Zytokin-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen nicht statistisch signifikant von den unbehandelten Kontrollgruppen ab, da die individuellen Schwankungen zu hoch waren. Ausgenommen davon waren IL-10 und TNF- α . Die LPS-induzierte Erhöhung von IL-6, IL-10 und MCP-1 im Zellkultur-Überstand wurde durch NH_4Cl in mono-kultivierter Mikroglia reduziert (Abbildung 11, Tabelle 7).

Tabelle 7: Effekte von NH₄Cl und LPS auf die Konzentration von Zytokinen in Zellkultur-Überständen mono-kultivierter Mikroglia

Mono-kultivierte Mikroglia wurden mit NH₄Cl (5mmol/l), LPS (100ng/ml) oder mit beiden gemeinsam für 18 Stunden inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Zytokin-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen wurden mittels Luminex Multiplex Assay gemessen und sind in pg/ml ausgedrückt. * statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.m.: nicht messbar. Daten aus n≥3 unabhängigen Experimenten.

Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag: Springer Nature; Neurochemical Research; Ammonia attenuates LPS-induced upregulation of pro-inflammatory cytokine mRNA in co-cultured astrocytes and microglia; Karababa, Groos-Sahr et. al; Copyright © 2016, Springer Nature; die Abbildungen wurden übersetzt.

Zytokin	Kontrolle (18h)	NH ₄ Cl (5mmol/l, 18h)	LPS (100ng/ml, 18h)	LPS+NH ₄ Cl
IL-1 α	n.m.	4,0 \pm 2,6	1912,8 \pm 1288,4	1338,0 \pm 1069,9
IL-1 β	3,6 \pm 2,6	4,5 \pm 3,9	1769,4 \pm 1108,9	1262,4 \pm 967,2
TNF- α	1,0 \pm 0,1	2,3 \pm 0,5	524,8 \pm 124,7*	447,0 \pm 148,7*
IFN- γ	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
IL-6	n.m.	45,4 \pm 45,4	17411,9 \pm 6960,7	6696,1 \pm 1714,4
MCP-1	162,0 \pm 110,6	172,2 \pm 58,1	4995,0 \pm 2106,3	3288,7 \pm 1584,2
IL-10	4,5 \pm 1,9	19,0 \pm 8,7	143,9 \pm 42,3*	74,0 \pm 11,3
TGF- β ₁	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
TGF- β ₂	16,5 \pm 2,4	4,5 \pm 0,5*	9,7 \pm 2,0	15,1 \pm 2,7
TGF- β ₃	39,0 \pm 26,9	12,2 \pm 6,1	16,1 \pm 9,1	60,4 \pm 2,7

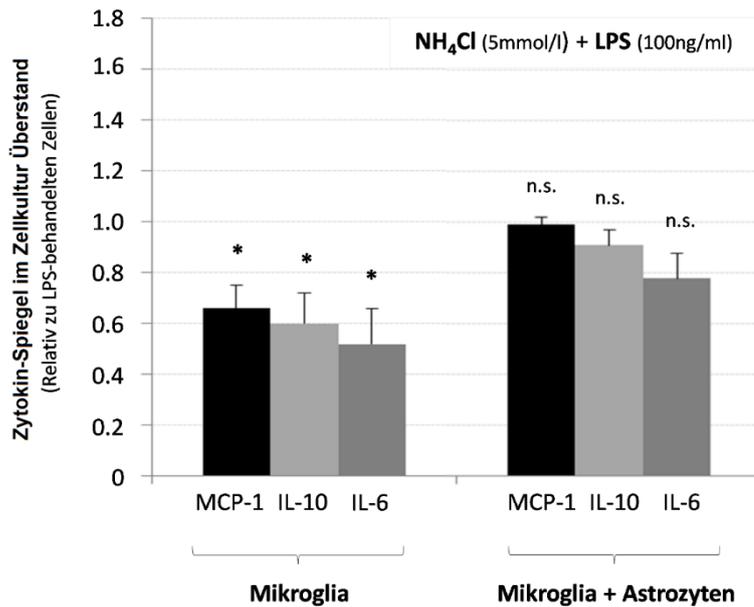


Abbildung 11: Effekte von NH_4Cl auf die LPS-vermittelte Freisetzung von MCP-1, IL-6 sowie IL-10 in mono-kultivierter Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.

Mono-kultivierte Ratten-Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurde entweder für 18 Stunden mit LPS (100ng/ml) oder LPS (100ng/ml) + NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt. Die Zytokin Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen wurden mittels Luminex Multiplex Assay gemessen. * statistisch signifikant unterschiedlich zu LPS-behandelten Zellen. n.s.: statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Daten aus n=4 unabhängigen Experimenten.

Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag; Springer Nature; Neurochemical Research; Ammonia attenuates LPS-induced upregulation of pro-inflammatory cytokine mRNA in co-cultured astrocytes and microglia; Karababa, Groos-Sahr et. al; Copyright © 2016, Springer Nature; die Abbildungen wurden übersetzt.

In Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurden durch LPS die Konzentrationen von IL- $1\alpha/\beta$, IL-6, IL-10, TNF- α und MCP-1 in den Zellkultur-Überständen signifikant erhöht (Tabelle 8). Die Inkubation mit LPS steigerte tendenziell die Konzentration von IL-10, hatte jedoch keinen Effekt auf die Konzentration von TGF- β_{1-3} in den Zellkultur-Überständen (Tabelle 8). Die Anwesenheit von NH_4Cl hatte in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen keinen Effekt auf die LPS-induzierte Zytokin-Freisetzung (Abbildung 11, Tabelle 8).

Die Ergebnisse legen nahe, dass Ammoniak die Konzentration *pro*-inflammatorischer Zytokine in mono-kultivierter Mikroglia und in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen nicht steigert und die LPS-induzierte Erhöhung der Zytokine in Zellkultur-Überständen von Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen nicht beeinflusst.

Tabelle 8: Effekte von NH₄Cl und LPS auf die Zytokin-Freisetzung in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen. Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen wurden mit NH₄Cl (5mmol/l), LPS (100ng/ml), oder beiden gemeinsam inkubiert für 18 Stunden oder blieben unbehandelt. Die Zytokin Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen wurden mittels Luminex Multiplex Assay gemessen und sind in pg/ml ausgedrückt. * statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.m.: Nicht messbar. Daten aus n=4-5 unabhängigen Experimenten.

Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag: Springer Nature; Neurochemical Research; Ammonia attenuates LPS-induced upregulation of pro-inflammatory cytokine mRNA in co-cultured astrocytes and microglia; Karababa, Groos-Sahr et. al; Copyright © 2016, Springer Nature; die Abbildungen wurden übersetzt.

Zytokin	Kontrolle (18h)	NH₄Cl (5mmol/l, 18h)	LPS (100ng/ml, 18h)	LPS+NH₄Cl
IL-1 α	6,2 \pm 6,2	4,0 \pm 4,0	706,2 \pm 155,7*	649,2 \pm 50,8*
IL-1 β	5,9 \pm 5,9	2,9 \pm 2,9	754,4 \pm 310,3*	569,5 \pm 156,5
TNF- α	1,4 \pm 0,4	3,2 \pm 1,2	565,3 \pm 143,3*	572,3 \pm 167,5*
IFN- γ	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
IL-6	136,6 \pm 136,6	135,7 \pm 135,7	34968,9 \pm 9030,4*	30912,3 \pm 9549,1*
MCP-1	4925,1 \pm 2275,7	6530,8 \pm 2271,6	25183,3 \pm 1990,8*	25013,1 \pm 2085,0*
IL-10	10,2 \pm 2,3	11,1 \pm 2,6	113,7 \pm 40,0	108,1 \pm 40,8
TGF- β ₁	569,5 \pm 16,7	573,3 \pm 36,0	564,3 \pm 30,8	551,4 \pm 35,8
TGF- β ₂	223,1 \pm 17,1	191,5 \pm 9,0	180,2 \pm 13,0	172,3 \pm 7,1
TGF- β ₃	33,6 \pm 2,3	30,3 \pm 2,0	27,9 \pm 1,1	25,1 \pm 2,1

3.5 Expression von TGR-5 in mono-kultivierter Mikroglia und Effekte von TGR-5-Agonisten auf die LPS-induzierte Expressionssteigerung *pro*-inflammatorischer Zytokine

Die Expression von TGR-5 wurde mittels Immunfluoreszenz-Analyse in mono-kultivierter Mikroglia untersucht. In Abbildung 12A ist zu sehen, dass TGR-5 sowohl in der Membran als auch im Zytosol von Ratten-Mikroglia *in vitro* lokalisiert ist.

Mono-kultivierte Mikroglia wurde mit LPS (1ng/ml) in An- oder Abwesenheit des Neurosteroids 5 β -pregnan-3 α -ol-20-on (Allopregnanolon, 10 μ mol/l, 30min Vorinkubation) (Abbildung 12B) oder der Gallensäure Tauroolithocholsäure (TLC, 10 μ mol/l, 30min Vorinkubation) (Abbildung 12C) für 18h inkubiert und die mRNA-Spiegel von IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α wurden nachfolgend mittels *Realtime*-PCR quantifiziert.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, wurde die durch LPS (1ng/ml, 18h) induzierte Hochregulation der mRNA-Spiegel von IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α durch 5 β -pregnan-3 α -ol-20-on signifikant abgeschwächt (Abbildung 12B). Gleichermaßen zeigte sich eine schwächere Hochregulation der mRNA-Spiegel von IL-1 β und IL-6 nach LPS in Gegenwart von TLC (Abbildung 12C).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass mono-kultivierte Mikroglia TGR-5 exprimiert. Weiterhin legen sie nahe, dass die TGR-5-Liganden Allopregnanolon und TLC die LPS-induzierte Hochregulation der mRNA Expression *pro*-inflammatorischer Zytokine in mono-kultivierter Mikroglia abschwächen.

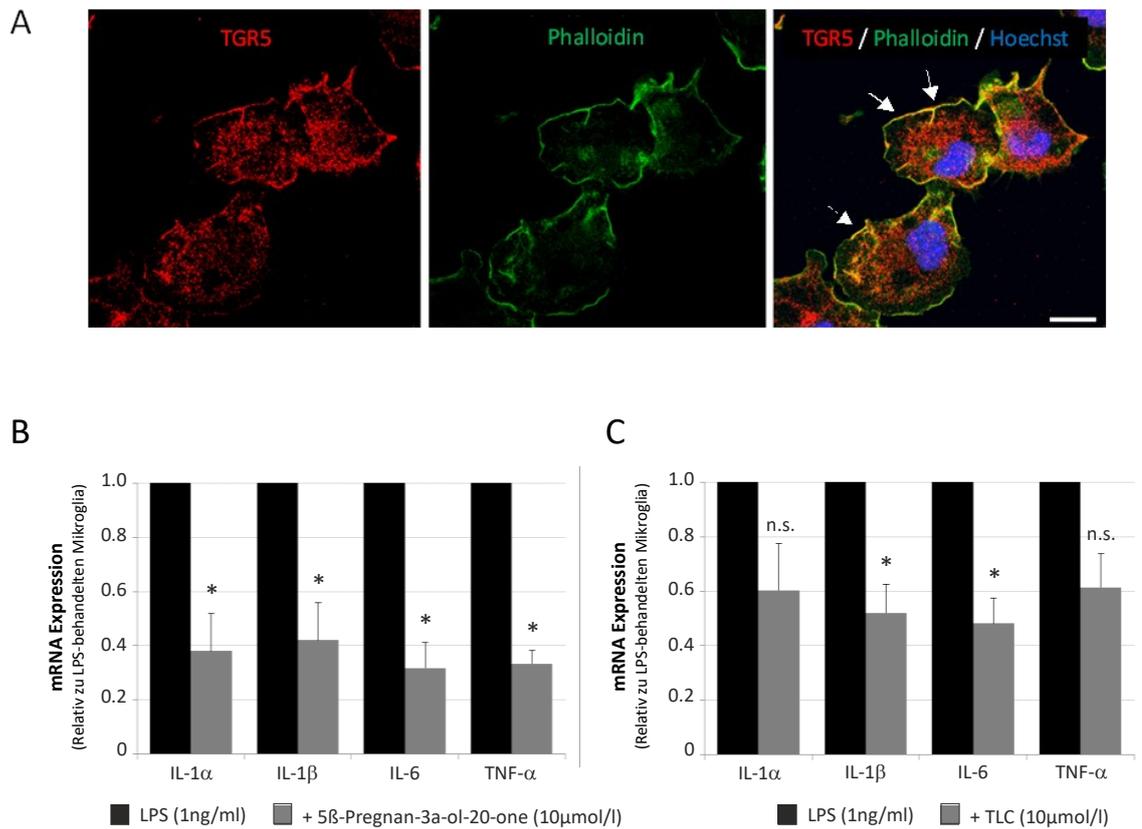


Abbildung 12: Expression von TGR-5 in mono-kultivierter Mikroglia und Effekte von Allopregnanolon sowie Tauroolithocholsäure auf die LPS-vermittelte Hochregulation *pro*-inflammatorischer Zytokin-mRNA. (A): Immunfluoreszenz-Analyse von TGR-5 in mono-kultivierter Mikroglia. Polymerisiertes Aktin wurde mittels Phalloidin–FTIC gegengefärbt, Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem 63x Objektiv angefertigt, der Maßstabsbalken entspricht 5μm. Pfeile: Zellmembran. (B, C): Mono-kultivierte Ratten-Mikroglia wurden entweder inkubiert mit LPS (1ng/ml), mit LPS (1ng/ml) + 5β-Pregnan-3α-ol-20-on (10μmol/l) (B) oder mit LPS (1ng/ml) + Tauroolithocholsäure (TLC, 10 μmol/l) (C) für 18 Stunden. Die mRNA Expressionsspiegel von IL-1α/β, IL-6 und TNF-α wurden mittels Realtime-PCR ermittelt und sind relativ zu LPS-behandelten Zellen angegeben. * statistisch signifikant unterschiedlich zur LPS-behandelten Kontrolle. n.s.: statistisch nicht signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. Daten aus n=3-6 unabhängigen Experimenten.

Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag: Springer Nature; Neurochemical Research; Ammonia attenuates LPS-induced upregulation of pro-inflammatory cytokine mRNA in co-cultured astrocytes and microglia; Karababa, Groos-Sahr et. al; Copyright © 2016, Springer Nature; die Abbildungen wurden übersetzt.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung von Ammoniak für Mikrogliaaktivierung und Inflammation

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Ammoniak weder die mRNA-Expression (Abbildung 8A, B) noch die Konzentration der *pro*-inflammatorischen Zytokine IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α (Tabelle 7, Tabelle 8) im Zellkultur-Überstand mono-kultivierter Mikroglia oder Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen steigert. Die Anwesenheit von Ammoniak führte jedoch zu einem signifikanten Abfall der mRNA-Spiegel von IL-12B und TGF- $\beta_{2,3}$ (Abbildung 8A) sowie der Konzentration von TGF- β_2 (Tabelle 7) im Zellkultur-Überstand mono-kultivierter Mikroglia, nicht aber in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (Abbildung 8B, Tabelle 8). TGF- β_2 wird im Gehirn exprimiert, hemmt dort die mikrogliale Synthese *pro*-inflammatorischer Zytokine und fördert den *anti*-inflammatorischen Mikroglia Phänotyp M2 (Paglinawan et al. 2003). Man nahm daher an, dass verringerte zerebrale TGF- β_2 -Spiegel Neuroinflammation begünstigen (Siglienti et al. 2007). Im zerebralen Kortex von Patienten mit Leberzirrhose und HE fanden sich unveränderte TGF- β_2 mRNA-Spiegel, aber gleichzeitig eine Expressionssteigerung von Surrogatmarkern für den *anti*-inflammatorischen Mikroglia-Phänotyp M2 (Görg et al. 2013). Daher erscheint es fraglich, ob die beobachteten *anti*-inflammatorischen Wirkungen von Ammoniak auf die LPS-induzierte Mikrogliaaktivierung durch TGF- β_2 vermittelt werden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass Ammoniak eine Expressionssteigerung des TGF- β_2 Proteins in Abwesenheit erhöhter mRNA-Spiegel vermittelt (Görg et al. 2013).

4.2 Bedeutung von Astrozyten für die LPS-induzierte Mikrogliaaktivierung *in vitro*

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Astrozyten die LPS-induzierte Hochregulation von Mikrogliaaktivierungsmarkern und *pro*-inflammatorischer Zytokine sowie die Herunterregulation *anti*-inflammatorischer Zytokine hemmen. Diese Annahme beruht auf einer schwächer ausgeprägten LPS-induzierten Transkription von IL-1 α/β , IL-6, TNF- α und CD14 mRNA und einer ebenfalls schwächer ausgeprägten LPS-induzierten Herunterregulation von TGF- β_2 und TGF- β_3 mRNA in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (Abbildung 9) im Vergleich zu mono-kultivierter Mikroglia. Dies könnte durch eine höhere Freisetzung von TGF- $\beta_{1,2}$ in

Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen im Vergleich zu mono-kultivierter Mikroglia erklärt werden (Tabelle 7, Tabelle 8).

Es zeigt sich weiterhin, dass Ammoniak in mono-kultivierter Mikroglia die LPS-induzierte mRNA Expressionsänderung sowie die Zytokinspiegel in Zellkultur-Überständen differentiell reguliert.

Ammoniak verstärkt die LPS-induzierte TNF- α mRNA-Expression in mono-kultivierter Mikroglia (Abbildung 10A), hemmt diese aber in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (Abbildung 10B). Ebenfalls hemmt Ammoniak die LPS-induzierte Hochregulation der mRNA der *pro*-inflammatorischen Zytokine IL-1 α/β und IL-6 (Abbildung 10B) sowie des Mikrogliaaktivierungsmarkers CD14 (Abbildung 10C) in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen, aber nicht in mono-kultivierter Mikroglia. Diese Resultate lassen vermuten, dass Ammoniak der Mikroglia-Reaktivität und durch Mikroglia vermittelten inflammatorischen Prozesse Astrozyten-abhängig entgegenwirkt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist derzeit unbekannt.

4.3 Effekte von Ammoniak auf die mRNA- und Protein-Spiegel *anti*-inflammatorischer Zytokine

Ammoniak dämpft zwar die LPS-induzierte Hochregulation der mRNA von IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α (Abbildung 10B), hatte jedoch weder in mono-kultivierter Mikroglia noch in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen einen Einfluss auf die LPS-vermittelte Erhöhung der Konzentration von IL-1 α/β , IL-6 oder TNF- α im Zellkultur-Überstand (Tabelle 8). Diese Diskrepanz kann durch Unterschiede in den zeitlichen Verläufen der LPS-induzierten Zytokin-Freisetzung und der Hemmung der LPS-induzierten Hochregulation der Zytokin-mRNA durch Ammoniak erklärt werden. Mit dieser Annahme übereinstimmend wurde in früheren Arbeiten vermutet, dass die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α in mono-kultivierter Mikroglia sehr schnell abläuft und bereits 3-6 Stunden nach Kontakt mit LPS fast abgeschlossen ist (Nakamura et al. 1999).

Da Änderungen der mRNA Expressionsspiegel sich nicht zwangsläufig auf der Ebene der Proteinexpression widerspiegeln, werden weitere Experimente benötigt, um zu untersuchen, ob Ammoniak die Freisetzung *pro*-inflammatorischer Zytokine in mit LPS inkubierten Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen reduziert. Dies ist von besonderem Interesse, da Ammoniak und *pro*-inflammatorische Zytokine synergistisch wirken bei

der Induktion von osmotischem und oxidativem Stress (Chastre et al. 2010; Rama Rao et al. 2010) sowie mitochondrialer Dysfunktion (Alvarez et al. 2011) in Astrozyten.

Interessanterweise hemmte Ammoniak die LPS-induzierte Freisetzung von MCP-1, IL-6 und IL-10 in mono-kultivierter Mikroglia, aber nicht in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (Abbildung 11). Jedoch geht die Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von IL-6 und IL-10 durch Ammoniak in mono-kultivierter Mikroglia nicht mit einer verminderten Transkription der zugehörigen Zytokin-mRNA einher (Abbildung 10A). Dies könnte darauf hinweisen, dass Ammoniak den Ablauf der Translation durch RNA-Oxidation beeinflusst (Görg et al. 2008). Ammoniak hemmte tendenziell in mono-kultivierter Mikroglia auch die LPS-induzierte Freisetzung weiterer Zytokine, wie z.B. von IL-1 α (Tabelle 7). Diese Daten lassen ebenfalls darauf schließen, dass interzelluläre Wechselwirkungen zwischen Astrozyten und Mikroglia die LPS-induzierte Inflammation beeinflussen. Daten, die aus Experimenten mit mono-kultivierter Mikroglia gewonnen werden, sollten daher im Hinblick auf die Situation im Gehirn mit Vorsicht betrachtet werden.

4.4 Regulation des *anti*-inflammatorischen Zytokins IL-10

Interessanterweise wurde die mRNA Expression des *anti*-inflammatorischen Zytokins IL-10 in mit LPS inkubierten Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen verstärkt (Abbildung 9A). Dies könnte der LPS-induzierten Synthese *pro*-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder TNF- α (Williams et al. 2004) durch eine Hemmung der Transkription oder durch Destabilisierung der betreffenden Zytokin-mRNAs (Bode et al. 2012; Sabat et al. 2010) entgegenwirken. Diese Effekte werden durch eine Aktivierung des *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3 vermittelt. Dies erfolgt über eine Hochregulation von Phosphatasen, die Nukleärer Faktor (NF) κ B-abhängigen Signalwegen entgegenwirken bzw. über einen Tristetraprolin (TTP)-abhängigen mRNA Abbau (Bode et al. 2012; Gaestel 2006; Sabat et al. 2010). Jedoch ist derzeit noch unbekannt, ob die Aktivierung von STAT-3 in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen durch LPS verstärkt wird.

4.5 Regulation des LPS-Rezeptors TLR-4

Die verminderte Reaktion auf LPS-induzierte Inflammation ist möglicherweise auch Folge einer Herunterregulation des LPS-Rezeptors TLR-4, ein Phänomen, das als „LPS-

Toleranz“ bezeichnet wird (Nomura et al. 2000). Die mRNA Expression von TLR-4 wird durch LPS deutlich herunterreguliert, sowohl in mono-kultivierter Mikroglia als auch in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen (Abbildung 9C), siehe hierzu auch (Marinelli et al. 2015). Allerdings wird die LPS-induzierte Herunterregulation der TLR-4 mRNA weder in mono-kultivierter Mikroglia noch in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen durch Ammoniak signifikant verstärkt (Abbildung 10C).

4.6 Bedeutung von PGE₂ für die Hemmung LPS-induzierter Mikrogliaaktivierung und Synthese pro-inflammatorischer Zytokine

Es wird vermutet, dass Ammoniak der Mikrogliaaktivität und mikroglial vermittelter Inflammation über einen Astrozyten-abhängigen Mechanismus entgegenwirkt. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin (PG) E₂ der LPS-induzierten Zytokin Freisetzung in Mikroglia entgegenwirkt (Caggiano und Kraig 1999; Levi et al. 1998). Allerdings scheint die Ammoniak-induzierte Freisetzung von PGE₂ aus Astrozyten (Görg et al. 2010a; Zemtsova et al. 2011) nicht für die Hemmung der LPS-induzierten Inflammation in Mikroglia relevant zu sein, da LPS in mono-kultivierter Mikroglia die Bildung von PGE₂ induziert (Zemtsova et al. 2011).

4.7 Bedeutung von Neurosteroiden für die Hemmung LPS-induzierter Inflammation

Die Transkription *pro*-inflammatorischer Zytokine in Mikroglia wird durch Neurosteroiden deutlich gehemmt (Wang et al. 2014; Wilms et al. 2003) und erhöhte Neurosteroid-Spiegel wurden auch im Gehirn von Tiermodellen für HE (Ahboucha et al. 2006) sowie in *post mortem* Hirngewebe von Patienten mit Leberzirrhose und HE gefunden (Ahboucha et al. 2008). Wir haben daher vermutet, dass Neurosteroiden bei HE die Synthese *pro*-inflammatorischer Zytokine über eine Aktivierung des Gallensäuren-Rezeptors Gpbar-1/TGR-5 vermitteln, TGR-5 fungiert im Gehirn als Neurosteroid-Rezeptor (Keitel et al. 2010; McMillin et al. 2015) und aktiviert *anti*-inflammatorische Signalwege in Kupffer-Zellen in der Leber (Keitel et al. 2008). Tatsächlich exprimieren Mikroglia TGR-5 *in vitro* (Abbildung 12A) sowie im Gehirn von Ratten (McMillin et al. 2015). Eine Aktivierung von TGR-5 durch Allopregnanolon oder die Gallensäure TLC (Keitel et al. 2010) dämpfte die LPS-induzierte Hochregulation *pro*-inflammatorischer Zytokin-mRNA in mono-kultivierter Mikroglia (Abbildung 12B, C).

Ammoniak verstärkt in Astrozyten die Expression des peripheren Benzodiazepin-Rezeptors (PBR), welcher wiederum für eine Steigerung der Neurosteroid-Synthese verantwortlich gemacht wird (Kruczek et al. 2011). Dies könnte für eine Astrozyten-abhängige Hemmung der LPS-induzierten Inflammation durch Neurosteroiden sprechen. Jedoch ist noch nicht geklärt, ob von Astrozyten stammende Neurosteroiden für den hemmenden Effekt von Ammoniak auf die LPS-induzierte Aktivierung von Mikroglia und die Synthese *pro*-inflammatorischer Zytokin-RNA ursächlich sind. Um dies zu klären sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.8 Mikrogliaaktivierung im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen ebenfalls überein mit den Ergebnissen von Transkriptom-Analysen, welche eine Hochregulation mikroglialer Aktivierungsmarker in humanen *postmortem* Hirnproben von Patienten mit Leberzirrhose und HE zeigen (Görg et al. 2013). Interessanterweise waren die Mikrogliaaktivierungsmarker und der *anti*-inflammatorische Mikroglia Phänotyp M2 in Proben von Patienten mit Leberzirrhose ohne HE nicht erhöht. Das weist darauf hin, dass die Aktivierung von Mikroglia und deren Differenzierung in den Phänotyp M2 eine Besonderheit bei der HE sind. Es bleibt jedoch ungeklärt, ob aktivierte Mikroglia vom Phänotyp M2 *anti*-inflammatorische Effekte fördern und ob die mikrogliale Aktivierung eine neuroprotektive Antwort im Gehirn von Patienten mit Leberzirrhose und HE induziert (Dennis et al. 2014; Zemtsova et al. 2011). Weitere Untersuchungen sind erforderlich um die Annahme, dass Mikroglia in den Phänotyp M2 im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE differenzieren, zu belegen. Unklar bleibt auch, ob Mikroglia in anderen Hirnregionen als dem zerebralen Kortex reaktiv werden.

Eine weitere Studie beschreibt eine Proliferation aktivierter Mikroglia sowie erhöhte Protein-Spiegel für IL-6, jedoch unveränderte Protein-Spiegel für IL-4, IL-10 und IFN- γ in 4 von 9 *post mortem* Hirnproben von Patienten mit Leberzirrhose und HE (Dennis et al. 2014). Jedoch ist die Aussagekraft dieser Beobachtung noch unklar, da IL-6 an vielen physiologischen Prozessen im Gehirn beteiligt ist und sowohl *anti*- als auch *pro*-inflammatorische Reaktionen vermitteln kann, je nachdem welche anderen Zytokine noch mit beteiligt sind (Gruol 2015; Rothaug et al. 2016). IL-6 steuert unter anderem den Schlaf (Gruol 2015; Hogan et al. 2003) und die Konzentration von IL-6 variiert sowohl im Gehirn von Nagern (Guan et al. 2005) als auch im menschlichen Blut

(Redwine et al. 2000) im Tag/Nacht-Rhythmus. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da Patienten mit Leberzirrhose und HE starke Auffälligkeiten in ihrem Schlaf-Wach-Rhythmus zeigen (Montagnese et al. 2014) sowie ebenfalls erhöhte IL-6 Spiegel im peripheren Blut (Montoliu et al. 2009).

Im Gegensatz zu IL-6 ist TNF- α ein rein *pro*-inflammatorisches Zytokin. Die TNF- α Protein-Spiegel im Gehirn von Patienten mit Leberzirrhose und HE sind jedoch unverändert (Dennis et al. 2014).

4.9 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Ammoniak die LPS-vermittelte Mikrogliaaktivität Astrozyten-vermittelt hemmt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang unbekannt. Ein denkbarer Mechanismus wäre, dass von Astrozyten gebildete Neurosteroiden *anti*-inflammatorische Effekte in Mikroglia vermitteln. Diese Befunde könnten die Abwesenheit von Mikrogliaaktivität und die Synthese *pro*-inflammatorischer Zytokine im zerebralen Kortex von Patienten mit Leberzirrhose und HE erklären (Dennis et al. 2014; Görg et al. 2015; Görg et al. 2013).

4.10 Limitationen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Mikrogliaaktivierungsmarkern und Zytokinen insbesondere auf mRNA Ebene untersucht. Dabei bleibt offen, ob die beobachteten mRNA-Expressionsänderungen auch auf Proteinebene sichtbar werden.

Es konnte außerdem nicht unmittelbar gezeigt werden, dass eine TGR5-Aktivierung durch Neurosteroiden, die durch Ammoniak aus Astrozyten freigesetzt werden, ursächlich ist für die Hemmwirkungen des Ammoniaks auf die LPS-induzierte Mikrogliaaktivierung und Zytokinsynthese.

4.11 Ausblick

Um die Annahme, dass Ammoniak Neurosteroid-vermittelt *anti*-inflammatorisch wirkt, bleibt zu prüfen, welche Effekte Ammoniak in TGR-5-Knockout-Mäusen vermittelt. Hierbei könnten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche an Zellen aus TGR-5-Knockout-Mäusen durchgeführt werden.

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswirkung von Lebererkrankungen auf das zentrale Nervensystem	5
Abbildung 2: Entstehung und Exazerbation des geringgradigen zerebralen Ödems bei der HE.....	7
Abbildung 3: Harnstoffzyklus.....	8
Abbildung 4: Synthese von Glutamin durch die Glutaminsynthetase.	9
Abbildung 5: Intrahepatische Metabolisierung von Ammoniak.	10
Abbildung 6: Modell zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie.	12
Abbildung 7: Delta-Delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$) -Methode zur relativen Quantifizierung.....	30
Abbildung 8: Effekte von NH_4Cl auf die Expression von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und des LPS-Rezeptors TLR4 in mono-kultivierter Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen	34
Abbildung 9: Effekt von LPS auf die mRNA Expression von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und des LPS-Rezeptors TLR4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.....	36
Abbildung 10: Effekte von NH_4Cl auf LPS-vermittelte Expressionsänderungen mRNAs von Zytokinen, Mikrogliaaktivierungsmarkern und dem LPS-Rezeptor TLR4 in mono-kultivierter Mikroglia und Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.....	38
Abbildung 11: Effekte von NH_4Cl auf die LPS-vermittelte Freisetzung von MCP-1, IL-6 sowie IL-10 in mono-kultivierter Mikroglia sowie Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.	41
Abbildung 12: Expression von TGR-5 in mono-kultivierter Mikroglia und Effekte von Allopregnanolon sowie Taurolithocholsäure auf die LPS-vermittelte Hochregulation <i>pro</i> -inflammatorischer Zytokin-mRNA.	44

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Child-Pugh-Klassifikation der Leberzirrhose.....	4
Tabelle 2: 1-Jahres-Überlebensrate nach Child-Score	4
Tabelle 3: Schweregrade der hepatischen Enzephalopathie.....	6
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Realtime-PCR Primer	26
Tabelle 5: Zusammensetzung Standard-Mix PCR.....	29
Tabelle 6: Geräteeinstellungen Realtime-PCR.....	30
Tabelle 7: Effekte von NH₄Cl und LPS auf die Konzentration von Zytokinen in Zellkultur-Überständen mono-kultivierter Mikroglia.....	40
Tabelle 8: Effekte von NH₄Cl und LPS auf die Zytokin-Freisetzung in Astrozyten/Mikroglia-Kokulturen.....	42

7 Literaturverzeichnis

- Abid S, Jafri W, Mumtaz K, Islam M, Abbas Z, Shah HA, Hamid S. 2011. Efficacy of L-ornithine-L-aspartate as an adjuvant therapy in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J Coll Physicians Surg Pak* 21:666-71.
- Ahboucha S, Butterworth RF. 2008. The neurosteroid system: implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 52:575-87.
- Ahboucha S, Jiang W, Chatauret N, Mamer O, Baker GB, Butterworth RF. 2008. Indomethacin improves locomotor deficit and reduces brain concentrations of neuroinhibitory steroids in rats following portacaval anastomosis. *Neurogastroenterol Motil* 20:949-57.
- Ahboucha S, Layrargues GP, Mamer O, Butterworth RF. 2005. Increased brain concentrations of a neuroinhibitory steroid in human hepatic encephalopathy. *Ann Neurol* 58:169-70.
- Ahboucha S, Pomier-Layrargues G, Mamer O, Butterworth RF. 2006. Increased Spiegel of pregnenolone and its neuroactive metabolite allopregnanolone in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *Neurochem Int* 49:372-8.
- Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
- Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C. 2004. Nonabsorbable disaccharides for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*:Cd003044.
- Alvarez VM, Rama Rao KV, Brahmabhatt M, Norenberg MD. 2011. Interaction between cytokines and ammonia in the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 89:2028-40.
- Amodio P, Bemeur C, Butterworth R, Cordoba J, Kato A, Montagnese S, Uribe M, Vilstrup H, Morgan MY. 2013. The nutritional management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism Consensus. *Hepatology* 58:325-36.
- Andersson AK, Ronnback L, Hansson E. 2005. Lactate induces tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 β release in microglial- and astroglial-enriched primary cultures. *J Neurochem* 93:1327-33.
- Arroyo V, Moreau R, Jalan R, Gines P. 2015. Acute-on-chronic liver failure: A new syndrome that will re-classify cirrhosis. *J Hepatol* 62:S131-43.
- Atkinson DE, Camien MN. 1982. The role of urea synthesis in the removal of metabolic bicarbonate and the regulation of blood pH. *Curr Top Cell Regul* 21:261-302.
- Augustin S, Altamirano J, Gonzalez A, Dot J, Abu-Suboh M, Armengol JR, Azpiroz F, Esteban R, Guardia J, Genesca J. 2011. Effectiveness of combined pharmacologic and ligation therapy in high-risk patients with acute esophageal variceal bleeding. *Am J Gastroenterol* 106:1787-95.
- Bajaj JS. 2010. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 31:537-47.
- Bajaj JS, O'Leary JG, Reddy KR, Wong F, Biggins SW, Patton H, Fallon MB, Garcia-Tsao G, Maliakkal B, Malik R and others. 2014. Survival in infection-related acute-on-chronic liver failure is defined by extrahepatic organ failures. *Hepatology* 60:250-6.
- Baulieu EE. 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23:963-87.

- Benarroch EE. 2007. Neurosteroids: endogenous modulators of neuronal excitability and plasticity. *Neurology* 68:945-7.
- Bode JG, Ehrling C, Häussinger D. 2012. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* 24:1185-94.
- Bruns T, Zimmermann HW, Stallmach A. 2014. Risk factors and outcome of bacterial infections in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 20:2542-54.
- Butterworth RF. 2011. Neuroinflammation in acute liver failure: mechanisms and novel therapeutic targets. *Neurochem Int* 59:830-6.
- Butterworth RF, Kircheis G, Hilger N, McPhail MJW. 2018. Efficacy of l-Ornithine l-Aspartate for the Treatment of Hepatic Encephalopathy and Hyperammonemia in Cirrhosis: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Clin Exp Hepatol* 8:301-313.
- Butz M, May ES, Häussinger D, Schnitzler A. 2013. The slowed brain: cortical oscillatory activity in hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 536:197-203.
- Butz M, Timmermann L, Braun M, Groiss SJ, Wojtecki L, Ostrowski S, Krause H, Pollok B, Gross J, Sudmeyer M and others. 2010. Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta Neurol Scand* 122:27-35.
- Caggiano AO, Kraig RP. 1999. Prostaglandin E receptor subtypes in cultured rat microglia and their role in reducing lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta production. *J Neurochem* 72:565-75.
- Canbay A, Gerken G. 2006. [Specific therapy in acute liver failure]. *Med Klin (Munich)* 101 Suppl 1:111-4.
- Canbay A, Jochum C, Bechmann LP, Festag S, Gieseler RK, Yuksel Z, Lutkes P, Saner FH, Paul A, Gerken G. 2009. Acute liver failure in a metropolitan area in Germany: a retrospective study (2002 - 2008). *Z Gastroenterol* 47:807-13.
- Canbay A, Tacke F, Hadem J, Trautwein C, Gerken G, Manns MP. 2011. Acute liver failure: a life-threatening disease. *Dtsch Arztebl Int* 108:714-20.
- Center SA, Magne ML. 1990. Historical, physical examination, and clinicopathologic features of portosystemic vascular anomalies in the dog and cat. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 5:83-93.
- Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. 2010. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 25:17-21.
- Child CG, Turcotte JG. 1964. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1:1-85.
- Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, Senzolo M, Rolles K, Patch D, Burroughs AK. 2006. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl* 12:1049-61.
- Cordoba J, Lopez-Hellin J, Planas M, Sabin P, Sanpedro F, Castro F, Esteban R, Guardia J. 2004. Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *J Hepatol* 41:38-43.
- Cordoba J, Ventura-Cots M, Simon-Talero M, Amoros A, Pavesi M, Vilstrup H, Angeli P, Domenicali M, Gines P, Bernardi M and others. 2014. Characteristics, risk factors, and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute-on-chronic liver failure (ACLF). *J Hepatol* 60:275-81.

- Dalal R, McGee RG, Riordan SM, Webster AC. 2017. Probiotics for people with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2: Cd008716.
- Dennis CV, Sheahan PJ, Graeber MB, Sheedy DL, Kril JJ, Sutherland GT. 2014. Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 29:1027-39.
- Deuel TF, Louie M, Lerner A. 1978. Glutamine synthetase from rat liver. Purification, properties, and preparation of specific antisera. *J Biol Chem* 253:6111-8.
- Eisenbach C, Sieg O, Stremmel W, Encke J, Merle U. 2007. Diagnostic criteria for acute liver failure due to Wilson disease. *World J Gastroenterol* 13:1711-4.
- Eltawil KM, Laryea M, Peltekian K, Molinari M. 2012. Rifaximin vs. conventional oral therapy for hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 18:767-77.
- Forner A, Llovet JM, Bruix J. 2012. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379:1245-55.
- Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP. 2011. Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors. *Front Biosci* 16:2326-41.
- Gaestel M. 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:120-30.
- Genesca J, Buti M. 2004. [Cytokines and liver cirrhosis]. *Med Clin (Barc)* 122:457-8.
- Gerber T, Schomerus H. 2000. Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Drugs* 60:1353-70.
- Gerok, W, „Hepatologie“, Urban & Schwarzenberg Verlag 1987, S.613, Kapitel: Häussinger und Gerok, Abb. 6
- Giatzakis C, Papadopoulos V. 2004. Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus nonsteroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity. *Endocrinology* 145:1113-23.
- Gines P, Quintero E, Arroyo V, Teres J, Bruguera M, Rimola A, Caballeria J, Rodes J, Rozman C. 1987. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 7:122-8.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. 2013. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7:45.
- Goh ET, Stokes CS, Sidhu SS, Vilstrup H, Gluud LL, Morgan MY. 2018. L-ornithine L-aspartate for prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 5: Cd012410.
- Görg B, Foster N, Reinehr R, Bidmon HJ, Hongen A, Häussinger D, Schliess F. 2003. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* 37:334-42.
- Görg B, Karababa A, Shafiqullina A, Bidmon HJ, Häussinger D. 2015. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia* 63:37-50.
- Görg B, Morwinsky A, Keitel V, Qvarthkhava N, Schror K, Häussinger D. 2010a. Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* 58:691-705.
- Görg B, Qvarthkhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. 2010b. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology* 52:256-65.
- Görg B, Qvarthkhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. 2008. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48:567-79.

- Görg B, Schliess F, Häussinger D. 2013. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 536:158-63.
- Gruol DL. 2015. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology* 96:42-54.
- Guan Z, Vgontzas AN, Omori T, Peng X, Bixler EO, Fang J. 2005. Interleukin-6 Spiegel levels fluctuate with the light-dark cycle in the brain and peripheral tissues in rats. *Brain Behav Immun* 19:526-9.
- Häussinger D. 1986. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv Enzyme Regul* 25:159-80.
- Häussinger D. 1990. Liver glutamine metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 14:56s-62s.
- Häussinger D. 2004. [Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenesis]. *Dtsch Med Wochenschr* 129 Suppl 2:S66-7.
- Häussinger D, Cordoba J, Kircheis G. 2006. Definition and assessment of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism*:423-432.
- Häussinger D, Gerok W. 1984. Hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism: impairment of glutamine synthesis in CCl₄ induced liver cell necrosis with no effect on urea synthesis. *Chem Biol Interact* 48:191-4.
- Häussinger D, Gerok W, Sies H. 1986. The effect of urea synthesis on extracellular pH in isolated perfused rat liver. *Biochem J* 236:261-5.
- Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. 2000. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 32:1035-8.
- Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. 1994. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 107:1475-80.
- Häussinger D, Schliess F. 2008. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57:1156-65.
- Häussinger D, Sies H. 2013. Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenetic concept. *Arch Biochem Biophys* 536:97-100.
- Häussinger D, Steeb R, Gerok W. 1990. Ammonium and bicarbonate homeostasis in chronic liver disease. *Klin Wochenschr* 68:175-82.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-94.
- Hernandez-Rabaza V, Agusti A, Cabrera-Pastor A, Fustero S, Delgado O, Taoro-Gonzalez L, Montoliu C, Llansola M, Felipe V. 2015. Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *J Neuroinflammation* 12:195.
- Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, Malaguarnera M, Agusti A, Llansola M, Felipe V. 2016. Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *J Neuroinflammation* 13:41.
- Hogan D, Morrow JD, Smith EM, Opp MR. 2003. Interleukin-6 alters sleep of rats. *J Neuroimmunol* 137:59-66.
- Jalan R, Gines P, Olson JC, Mookerjee RP, Moreau R, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Kamath PS. 2012. Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol* 57:1336-48.

- Jalan R, Williams R. 2002. *Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. Blood Purif* 20:252-61.
- Janzer RC, Raff MC. 1987. *Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. Nature* 325:253-7.
- Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. 2009a. *Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. J Neurochem* 109:485-93.
- Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. 2009b. *Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. J Cereb Blood Flow Metab* 29:944-52.
- Kaiser S, Gerok W, Häussinger D. 1988. *Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonaemia in chronic liver disease. Eur J Clin Invest* 18:535-42.
- Karababa A*, Groos-Sahr K*, Albrecht U, Keitel V, Shafiqullina A, Görg B, Häussinger D. 2017. *Ammonia Attenuates LPS-Induced Upregulation of Pro-Inflammatory Cytokine mRNA in Co-Cultured Astrocytes and Microglia. Neurochem Res* 42:737-749.
- Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Häussinger D. 2008. *Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. Biochem Biophys Res Commun* 372:78-84.
- Keitel V, Görg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Spomer L, Zilles K, Häussinger D. 2010. *The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. Glia* 58:1794-805.
- Kircheis G, Knoche A, Hilger N, Manhart F, Schnitzler A, Schulze H, Häussinger D. 2009. *Hepatic encephalopathy and fitness to drive. Gastroenterology* 137:1706-15.e1-9.
- Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. 2002. *Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. Hepatology* 35:357-66.
- Koch A, Herbers U. 2016. *Erkrankungen der Leber. Ernährung & Medizin* 31:57-61.
- Kraft AD, Harry GJ. 2011. *Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. Int J Environ Res Public Health* 8:2980-3018.
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schliess F, Häussinger D. 2011. *Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. Biol Chem* 392:1155-65.
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kroncke KD, Schliess F, Häussinger D. 2009. *Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. Glia* 57:79-92.
- Labzin LI, Heneka MT, Latz E. 2018. *Innate Immunity and Neurodegeneration. Annu Rev Med* 69:437-449.
- Lachmann V, Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Häussinger D. 2013. *Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. Arch Biochem Biophys* 536:143-51.
- Laleman W, Simon-Talero M, Maleux G, Perez M, Ameloot K, Soriano G, Villalba J, Garcia-Pagan JC, Barrufet M, Jalan R and others. 2013. *Embolization of large spontaneous portosystemic shunts for refractory hepatic encephalopathy: a multicenter survey on safety and efficacy. Hepatology* 57:2448-57.
- Lan NC, Gee KW. 1994. *Neuroactive steroid actions at the GABAA receptor. Horm Behav* 28:537-44.

- Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF. 1990. Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 11:874-8.
- Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. 2008. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 47:1401-15.
- Levi G, Minghetti L, Aloisi F. 1998. Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E2 on microglial functions. *Biochimie* 80:899-904.
- Ling EA, Wong WC. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.
- Lu J, Moochhala S, Kaur C, Ling EA. 2001. Cellular inflammatory response associated with breakdown of the blood-brain barrier after closed head injury in rats. *J Neurotrauma* 18:399-408.
- Lunia MK, Sharma BC, Sharma P, Sachdeva S, Srivastava S. 2014. Probiotics prevent hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a randomized controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12:1003-8.e1.
- Lusty CJ. 1978. Carbamoylphosphate synthetase I of rat-liver mitochondria. Purification, properties, and polypeptide molecular weight. *Eur J Biochem* 85:373-83.
- Lynch MA. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- Marinelli C, Di Liddo R, Facci L, Bertalot T, Conconi MT, Zusso M, Skaper SD, Giusti P. 2015. Ligand engagement of Toll-like receptors regulates their expression in cortical microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation* 12:244.
- Mas A, Rodes J, Sunyer L, Rodrigo L, Planas R, Vargas V, Castells L, Rodriguez-Martinez D, Fernandez-Rodriguez C, Coll I and others. 2003. Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. *J Hepatol* 38:51-8.
- Matthiessen HP, Schmalenbach C, Muller HW. 1989. Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* 2:177-88.
- McMillin M, Frampton G, Tobin R, Dusio G, Smith J, Shin H, Newell-Rogers K, Grant S, DeMorrow S. 2015. TGR5 signaling reduces neuroinflammation during hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 135:565-76.
- Montagnese S, De Pitta C, De Rui M, Corrias M, Turco M, Merkel C, Amodio P, Costa R, Skene DJ, Gatta A. 2014. Sleep-wake abnormalities in patients with cirrhosis. *Hepatology* 59:705-12.
- Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, Felipe V. 2009. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* 43:272-9.
- Moreau R. 2015. Role of Infections in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Dig Dis* 33:577-81.
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M and others. 2013. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 144:1426-37, 1437.e1-9.
- Müller-Preuss P, Rupprecht R, Lancel M. 2002. The effects of the neuroactive steroid 3 alpha,5 alpha-THDOC on sleep in the rat. *Neuroreport* 13:487-90.

- Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. 2000. High Spiegel of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 182:1103-8.
- Nakamura Y, Si QS, Kataoka K. 1999. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res* 35:95-100.
- NeSmith M, Ahn J, Flamm SL. 2016. Contemporary Understanding and Management of Overt and Covert Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 12:91-100.
- Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K and others. 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164:3476-9.
- Norenberg MD. 1979. Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem* 27:756-62.
- Norenberg MD. 1998. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13:319-35.
- O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. 1989. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 97:439-45.
- Oenarto J, Karababa A, Castoldi M, Bidmon HJ, Görg B, Häussinger D. 2016. Ammonia-induced miRNA expression changes in cultured rat astrocytes. *Sci Rep* 6:18493.
- Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, Arroliga AC, Mullen KD. 2003. Correlation between ammonia Spiegel and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 114:188-93.
- Paglinawan R, Malipiero U, Schlapbach R, Frei K, Reith W, Fontana A. 2003. TGFbeta directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. *Glia* 44:219-31.
- Palomero-Gallagher N, Zilles K. 2013. Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: a review. *Arch Biochem Biophys* 536:109-21.
- Paul SM, Purdy RH. 1992. Neuroactive steroids. *Faseb j* 6:2311-22.
- Prakash R, Mullen KD. 2010. Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:515-25.
- Prasad S, Dhiman RK, Duseja A, Chawla YK, Sharma A, Agarwal R. 2007. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45:549-59.
- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. 1973. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 60:646-9.
- Qaiser MZ, Dolman DEM, Begley DJ, et al. Uptake and metabolism of sulphated steroids by the blood-brain barrier in the adult male rat. *J Neurochem*. 2017;142(5):672-685. doi:10.1111/jnc.14117
- Qvartskhava N, Lang PA, Görg B, Pozdeev VI, Ortiz MP, Lang KS, Bidmon HJ, Lang E, Leibrock CB, Herebian D and others. 2015. Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:5521-6.
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Tong X, Alvarez VM, Norenberg MD. 2010. Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. *J Neuroinflammation* 7:66.

- Redwine L, Hauger RL, Gillin JC, Irwin M. 2000. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin Spiegelns in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3597-603.
- Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. 2016. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta* 1863:1218-27.
- Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:331-44.
- Sawhney R, Holland-Fischer P, Rosselli M, Mookerjee RP, Agarwal B, Jalan R. 2016. Role of ammonia, inflammation, and cerebral oxygenation in brain dysfunction of acute-on-chronic liver failure patients. *Liver Transpl* 22:732-42.
- Schepke M, Kleber G, Nurnberg D, Willert J, Koch L, Veltzke-Schlieker W, Hellerbrand C, Kuth J, Schanz S, Kahl S and others. 2004. Ligation versus propranolol for the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis. *Hepatology* 40:65-72.
- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. 2002. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* 16:739-41.
- Schmid M, Peck-Radosavljevic M, Konig F, Mittermaier C, Gangl A, Ferenci P. 2010. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of intravenous L-ornithine-L-aspartate on postural control in patients with cirrhosis. *Liver Int* 30:574-82.
- Sergeeva OA. 2013. GABAergic transmission in hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 536:122-30.
- Sharma BC, Sharma P, Lunia MK, Srivastava S, Goyal R, Sarin SK. 2013. A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 108:1458-63.
- Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. 2004. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* 40:247-54.
- Shawcross DL, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD. 2010. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 51:1062-9.
- Siglienti I, Chan A, Kleinschnitz C, Jander S, Toyka KV, Gold R, Stoll G. 2007. Downregulation of transforming growth factor-beta2 facilitates inflammation in the central nervous system by reciprocal astrocyte/microglia interactions. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:47-56.
- Sikorska H, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. 2010. [Physiological functions of L-ornithine and L-aspartate in the body and the efficacy of administration of L-ornithine-L-aspartate in conditions of relative deficiency]. *Pol Merkur Lekarski* 28:490-5.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM and others. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 315:801-10.
- Smith DD, Jr., Campbell JW. 1988. Distribution of glutamine synthetase and carbamoyl-phosphate synthetase I in vertebrate liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:160-4.
- Teschke R. 2009. Hepatotoxicity by drugs and dietary supplements: safety perspectives on clinical and regulatory issues. *Ann Hepatol* 8:184-95.

- Trey C, Davidson CS. 1970. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 3:282-98.
- Vallee M, Mayo W, Koob GF, Le Moal M. 2001. Neurosteroids in learning and memory processes. *Int Rev Neurobiol* 46:273-320.
- Wang M, Wang X, Zhao L, Ma W, Rodriguez IR, Fariss RN, Wong WT. 2014. Macroglia-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina. *J Neurosci* 34:3793-806.
- Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, Timmer-Stranghoner A, Vidacek D, Siewert E, Bach J, Geier A, Purucker EA, Gressner AM and others. 2005. Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. *J Hepatol* 42:195-201.
- Wetterling T. 2002. *Pathophysiologische Grundlagen. Organische psychische Störungen: Hirnorganische Psychosyndrome. Heidelberg: Steinkopff.* p 17-66.
- Wickert L, Steinkruger S, Abiaka M, Bolkenius U, Purps O, Schnabel C, Gressner AM. 2002. Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF-beta-isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR Green PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 295:330-5.
- Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 172:567-76.
- Wilms H, Claasen J, Rohl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. 2003. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis* 14:417-24.
- Wilson JX, Young GB. 2003. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Can J Neurol Sci* 30:98-105.
- Zemtsova I, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schror K, Häussinger D. 2011. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology* 54:204-15.
- Zhan T, Stremmel W. 2012. The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Dtsch Arztebl Int* 109:180-7.
- Zieve L, Doizaki WM, Zieve J. 1974. Synergism between mercaptans and ammonia or fatty acids in the production of coma: a possible role for mercaptans in the pathogenesis of hepatic coma. *J Lab Clin Med* 83:16-28.

Die mit * markierten Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen und teilen somit die Erst-Autorenschaft.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dieter Häussinger für die Möglichkeit diese Arbeit zu erstellen und für die Unterstützung und Betreuung bei der Planung und Durchführung Selbiger.

Ich danke zudem Herrn Dr. oec. troph. Boris Görg, der mir im Labor zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Vielen Dank für deinen Einsatz und deine Mühe.

Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Ayse Karababa, Jessica Oernato, Aygul Shafigullina, Dr. rer. nat. Ute Albrecht, Torsten Janssen, Ursula Kristek und Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino für die Unterstützung im Labor bei der Einarbeitung, Durchführung und Auswertung verschiedener Versuchsreihen.

Allen Mitarbeitern des Labors des SFB 974 danke ich für das nette Miteinander und die Hilfsbereitschaft – wenn etwas mal nicht ganz so funktioniert hat wie geplant.

Unabhängig von der unermüdlichen Unterstützung während des Erschaffensprozesses dieser Arbeit, der liebevollen Motivation und den wiederholten kleinen Schubsern (die nötig waren), danke ich meinen Eltern dafür, dass ihr mich zu dem Menschen gemacht habt, der ich bin. Danke, dass ihr immer für mich und uns da seid, ohne euch gäbe es diese Arbeit nicht.

Meinem Mann, Korbinian Lenz, möchte ich für so Vieles danken. Danke, dass du immer hinter mir stehst. Du machst mich komplett und hast mir mit unserer Tochter das größte Geschenk gemacht.

