

Johannes Maximilian Ludwig

Dr. med.

**Charakterisierung antiinflammatorischer Eigenschaften von Ursodeoxycholyll-  
Lysophosphatidylethanolamid in Endotoxin-vermittelten entzündlichen  
Lebererkrankungen**

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolfgang Stremmel

Die Entzündung der Leber ist eine wichtige Komponente in einer Vielzahl von akuten und chronischen Lebererkrankungen und trägt so zum Fortschreiten des Leberschaden, der Leberfibrose, sowie der Karzinomentwicklung bis schlussendlich hin zum Leberversagen mit deutlichen Folgen für die Homöostase des gesamten Organismus. Eine gesteigerte Exposition der Leber mit Lipopolysacchariden (LPS) im Rahmen eines akuten septischen Schocks oder aufgrund einer gestörten intestinalen Barriere, wie Sie z.B. eine Rolle in der Pathogenese der alkoholischen und nicht-alkoholischen Steatohepatitis spielt, führt über die Stimulation des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) zu einer Kupferzellen (Lebermakrophagen) vermittelten Inflammationsreaktion mit subsequenter Funktionseinschränkung und Schädigung der Leber. Diese kann durch die von den Lebermakrophagen im inflammatorischen Milieu aktivierten hepatischen Sternzellen (HSC) verstärkt werden und schlussendlich in einer Leberfibrose resultieren.

Obgleich der anhaltenden Bemühungen zur Identifizierung bzw. Entwicklung spezifischer antiinflammatorischer Therapien ist es trotz vielversprechender Ansätze bislang nicht gelungen einen durchschlagenden Erfolg zu erzielen der einen Einzug in die klinische Behandlung erhielt. Demnach erscheint es notwendig die Bemühungen diesbezüglich zu intensivieren um einerseits die physiologisch wichtigen Funktionen für den Organismus aufrechtzuerhalten und andererseits einer Schädigung der Leber mit allen drohenden Konsequenzen entgegenzuwirken.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin die antiinflammatorischen Eigenschaften des neu entwickelten Gallensäure-Phospholipidkonjugat UDCA-LPE im murinen Akutschadensmodell GalN/LPS der Leber *in vivo* sowie in LPS stimulierten primären Kupferzellen bzw. der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 zu charakterisieren. Weiterführend wurde untersucht ob die UDCA-LPE vermittelten Effekte der mit LPS stimulierten Makrophagenzelllinie eine Auswirkung auf die inflammatorische und profibrotische Reaktion der HSC ausübt. Dabei ist es gelungen für UDCA-LPE eine potente antiinflammatorische Wirkkomponente *in vivo* und *in vitro* nachzuweisen. Für die *in vivo* Versuche im GalN/LPS-Modell als auch *in vitro* in der Makrophagenzelllinie konnte eine deutliche Hemmung der mRNA Expression proinflammatorischer Mediatoren (IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , NOX-2) nachgewiesen werden. Ergänzend konnte in der Makrophagenzelllinie und den HSC im inflammatorischen Milieu eine UDCA-LPE vermittelte Abnahme der LPS bzw. Inflammations induzierten Chemokin mRNA Expression (MCP-1, RANTES), analog zu den bereits publizierten Ergebnissen des GalN/LPS-Modells, gezeigt werden. Eine ergänzende IL-6 ELISA Untersuchung der Makrophagenzelllinie bestätigte den Effekt der ausgeprägten mRNA Hemmung auch auf Proteinebene. Im Vergleich fiel die UDCA-LPE bedingte Inflammationsinhibition auf mRNA Ebene in

den primären Kupfferzellen (IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1) deutlich weniger potent aus. Weiterführende Untersuchungen des TLR4 Signalweges wie z.B. TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B legten den Schluss einer Wirkung über die Beeinflussung dieses Signalweges nahe.

Untersuchungen der Makrophagenzelllinie offenbarten eine Hemmung der proinflammatorischen iNOS durch UDCA-LPE. Jedoch kam es sogar zu einer Zunahme der NO-Produktion welche mittels Western Blot Analysen von iNOS und p-eNOS, sowie iNOS Inhibitionsuntersuchungen auf die als protektiv beschriebene eNOS zurückgeführt werden konnte. Weiterführende Untersuchungen offenbarten eine Aktivierung der eNOS über die durch UDCA-LPE abhängige Aktivierung von AKT und ERK1/2. Insgesamt ist bei reduzierter NOX-2 Expression, einem Surrogatmarker für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), von einer protektiven und antiinflammatorische Wirkung des Konjugates durch eine deutliche Verschiebung des Verhältnisses von NO und ROS zugunsten des protektiven NO mit konsekutiv verminderter Bildung der schädlicher Peroxynitrite auszugehen.

Untersuchungen bezüglich einer profibrotischen Reaktion der HSC im inflammatorischen Milieu der Makrophagenzelllinie offenbarten einen erhöhten Aktivierungsstatus ( $\alpha$ -SMA) im Western Blot sowie eine deutlich gestiegene Produktion des profibrotischen CTGF Moleküls auf Protein und mRNA Ebene. Die Inflammationsinhibition der Makrophagenzelllinie mit UDCA-LPE konnte die Aktivierung als auch die CTGF Produktion der HSC deutlich senken wobei neben der entzündungshemmenden Wirkung auch von einer verminderte Aktivierung von SMAD 2/3 des TGF- $\beta$  Signalweges als elementarer Wirkansatz von UDCA-LPE angesehen werden kann. Aufgrund der ausgeprägten inflammatorischen CTGF Induktion der HSC sowie der starken Reduktion durch UDCA-LPE wurde, bei analogem Verhalten des unter anderem profibrotischen wirkenden IL-6 der Makrophagenzelllinie, überprüft ob IL-6 CTGF zu induzieren vermag. In dieser Arbeit konnte so erstmalig gezeigt werden dass IL-6 in HSC, neben der bekannten Stimulation durch TGF- $\beta$ , einen CTGF Induktor darstellt wenngleich die Potenz im Vergleich zu TGF- $\beta$  oder im inflammatorischen Milieu geringer ausfällt. UDCA-LPE direkt vermochte die IL-6 stimulierte CTGF Expression deutlich zu senken. Eine Analyse der Signalwege offenbarten eine Hemmung der Aktivierung des IL-6 Signalwegmolekül Stat3 durch UDCA-LPE wohingegen die CTGF Induktion durch IL-6 unabhängig von SMAD 2/3 verlief.

Schlussfolgernd zeigte UDCA-LPE potente antiinflammatorische Eigenschaften in Lipopolysaccharid stimulierten Immunzellen *in vitro* und *in vivo* und minderte folglich die Aktivierung der profibrotischen hepatischen Sternzellen im Rahmen der Inflammation *in vitro*. Dies Ergebnisse legen weitere präklinische und klinische Untersuchungen nahe, um den zukünftigen Einsatz von UDCA-LPE zur Behandlung der Leberinflammation zu ermöglichen.