

Kapitel 4. Ergebnisse

In den folgenden Passagen werden die Versuchsergebnisse dargestellt. Alle Daten wurden statistisch mit der Prism 3.02v Software (GraphPad, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des zweiseitigen *student t-test* ermittelt und ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen.

Zu Beginn werden die Ergebnisse der Gas-Chromatographie zur Leberfettzusammensetzung tabellarisch dargestellt. Im Anschluss werden die Messwerte der Alaninaminotransaminase vorgestellt und tabellarisch und graphisch veranschaulicht. Außerdem werden die lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Unterschiede im Lebergewebe in den verschiedenen Versuchsgruppen aufgezeigt. Zum Schluss wird die Expression verschiedener Zytokine dargestellt und erörtert, die mittels ELISA und Echtzeit RT-PCR untersucht wurden.

4.1 Ergebnisse der mittels Gas-Chromatographie gemessenen Leberfettkonzentrationen

Für den Vergleich der Leberfettzusammensetzung in Wildtyp- und Fat-1-Mäusen ist die Gas-Chromatographie das entscheidende Messverfahren. Dazu wurden die Proben wie in 2.3.2 beschrieben aufgearbeitet und gemessen. Das Messergebnis zeigt, welchen prozentualen Anteil die Menge die jeweilige Fettsäure an allen detektierten Fettsäuren hatte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Wie in Tabelle 3 und Abbildung 3 zu erkennen ist, wiesen Wildtyp-Mäuse einen hohen Anteil an Omega-6-Fettsäuren (Gesamtanteil n-6-PUFA 43.46 ± 1.539) in der Leber auf, während ihr Anteil an Omega-3-Fettsäuren mit 0.918 ± 0.252 gering ausfiel. Daraus ergab sich eine Ratio von n-6-PUFA zu n-3-PUFA von 64.61 ± 16.78 .

Tiere der Fat-1-Gruppe hingegen hatten einen signifikant höheren Anteil an endogen gebildeten Omega-3-Fettsäuren (Gesamtanteil n-3-PUFA 6.970 ± 0.318 ; $P < 0.001$ vs. Wildtyp-Gruppe, N=5). Die auffälligsten Unterschiede im Vergleich zu der Gruppe der Wildtyp-Mäuse zeigten die Fat-1-Mäuse in den Konzentrationen der Omega-3-Fettsäuren α -Linolensäure (18:3 n-3), Eicosapentaensäure (20:5 n-3) sowie Docosahexaensäure (22:6 n-3).

Fettsäure	Wildtyp-Mäuse	Fat-1-Mäuse
	% an den gesamten Fettsäuren	
18:2 n-6	27.01 ± 0.805	28.63 ± 1.474
18:3 n-3	n. d.	0.059 ± 0.02*
20:4 n-6	14.30 ± 1.842	11.12 ± 0.815
20:5 n-3	n. d.	0.29 ± 0.029*
22:4 n-6	0.919 ± 0.078	0.485 ± 0.11*
22:5 n-6	3.386 ± 0.511	0.668 ± 0.19**
22:5 n-3	n. d.	0.448 ± 0.036*
22:6 n-3	0.918 ± 0.252	6.174 ± 0.311***
Total n-6	43.46 ± 1.539	40.90 ± 1.199
Total n-3	0.918 ± 0.252	6.970 ± 0.318***
Ratio n-6/ n-3	64.61 ± 16.78	5.896 ± 0.209**

Tabelle 3 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren in der Leber von Wildtyp- und Fat-1-Mäusen, durch die Gas-Chromatographie analysiert, n. d. = nicht detektierbar, *** $P < 0.001$ vs. Wildtyp-Mäuse, $N=5$; ** $P < 0.01$ vs. Wildtyp-Mäuse, $N=5$; * $P < 0.05$ vs. Wildtyp-Mäuse, $N=5$

Diese Omega-3-Fettsäuren waren, wie in Abbildung 3 zu sehen ist, bei Wildtyp-Tieren fast komplett abwesend. Dies führte zu einer deutlich unterschiedlichen n-6/n-3-Ratio von $5.896 \pm 0.209^{**}$ in Fat-1-Tieren (** $P < 0.01$ vs. Wildtyp-Gruppe, $N=5$) im Vergleich zu 64.61 ± 16.78 in den Tieren vom Wildtyp.

Beim Vergleich des Anteils von Omega-6-Fettsäuren in beiden Gruppen konnten signifikante Unterschiede nur im Gehalt von 22:4 n-6 und 22:5 n-6 ermittelt werden. Sowohl die Messwerte in Tabelle 2 als auch die Peaks der Gas-Chromatographie in Abbildung 3 zeigten in der für Entzündungsreaktionen wichtigsten Omega-6-Fettsäure, Arachidonsäure (20:4 n-6), allenfalls geringe aber nicht statistisch signifikante Unterschiede.

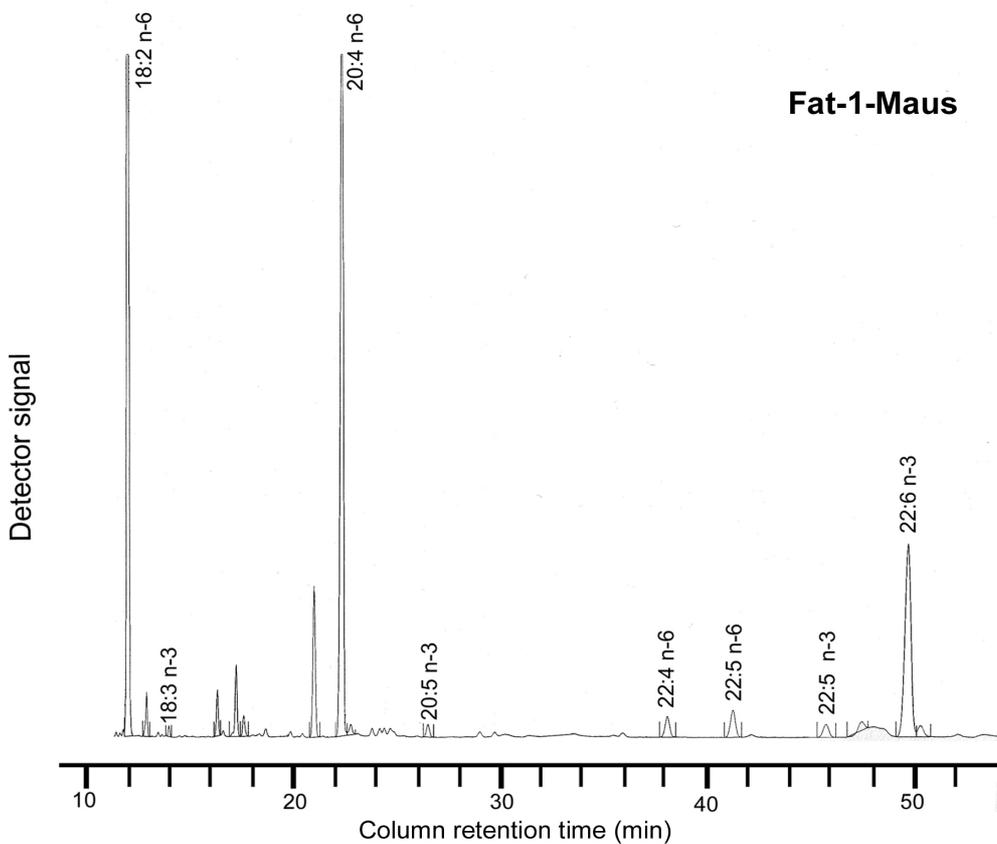
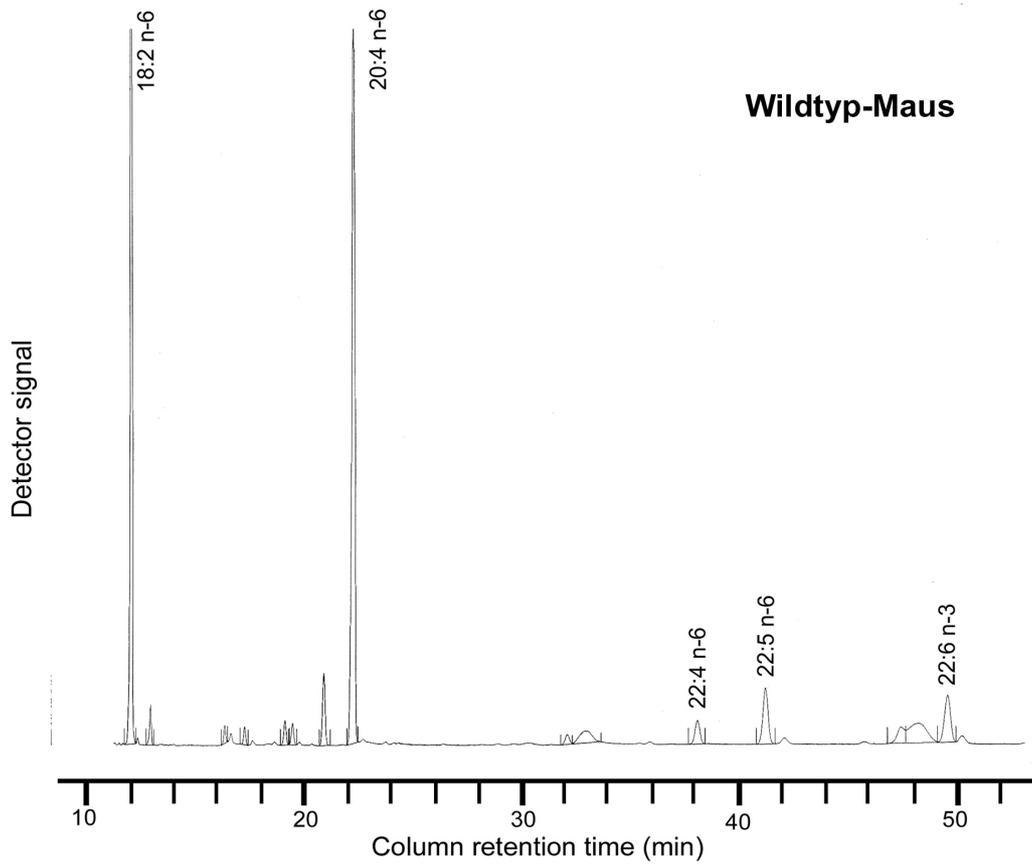


Abbildung 3 Gas-Chromatographiesignale zweier repräsentativer Versuchstiere zeigen die verschiedenen Fettsäuren im Lebergewebe von Wildtyp- und Fat-1-Tieren

Ebenfalls ist zu erkennen, dass die gesamte Fraktion von Omega-6-Fettsäuren beider Versuchsgruppen im Vergleich statistisch nicht signifikant unterschiedlich war.

Aus diesen Ergebnissen kann man zusammenfassend feststellen, dass die auffälligen Unterschiede in der n-6/n-3-Ratio zwischen Wildtyp- und Fat-1-Mäusen besonders auf den hohen Gehalt an Omega-3-Fettsäuren in Fat-1-Mäusen zurückzuführen war. Der Gehalt an Omega-6-Fettsäuren in beiden Gruppen konnte als weitgehend konstant nachgewiesen werden.

4.2 Ergebnisse der ALT-Messung im Serum

Die Messung der Alaninaminotransferase stellt einen wichtigen Indikator zur Bewertung des Ausmaßes der Leberschädigung dar. Hierbei wird der Übertritt des in den Hepatozyten lokalisierten Enzyms in den Blutkreislauf aufgrund einer Schädigung der Leberzellen gemessen. 6 Stunden nach der Injektion von D-GaIN/LPS wurde allen Tieren durch eine Herzpunktion Blut entnommen und die Aktivität der ALT im Blutserum wie in 2.4.2 beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 4 dargestellt.

Gruppe	ALT-Aktivität im Serum in U/l
1. Fat-1-Hepatitis	801,2 ± 154,3**; N=5
2. Wildtyp-Hepatitis	4773 ± 1036; N=5
3. Fat-1-Kontrollgruppe	57,61 ± 18,60; N=3
4. Wildtyp-Kontrollgruppe	38,72 ± 20,36; N=3

Tabelle 4 ALT-Aktivität im Serum 6 Stunden nach der Hepatitis-Induktion durch D-GaIN/LPS;

** $P < 0,01$ vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, N=5

Wie in Tabelle 4 und Abbildung 4 zu erkennen ist, zeigte sowohl die Fat-1-Gruppe als auch die Wildtyp-Gruppe nach einer D-GaIN/LPS-Injektion eine deutliche Erhöhung der ALT-Aktivität im Serum, verglichen mit den gesunden Kontrolltieren. Die Injektion von D-GaIN/LPS hat somit sicher zu einer Leberentzündung in den Tieren geführt.

Weiterhin kann man erkennen, dass die Serum-ALT-Aktivität in der Fat-1-Hepatitis-Gruppe ($801,2 \pm 154,3^{**}$, N=5; ** $P < 0,01$) signifikant unterhalb der in Wildtyp-Hepatitis-Tieren (4773 ± 1036 , N=5) lag.

Serum ALT

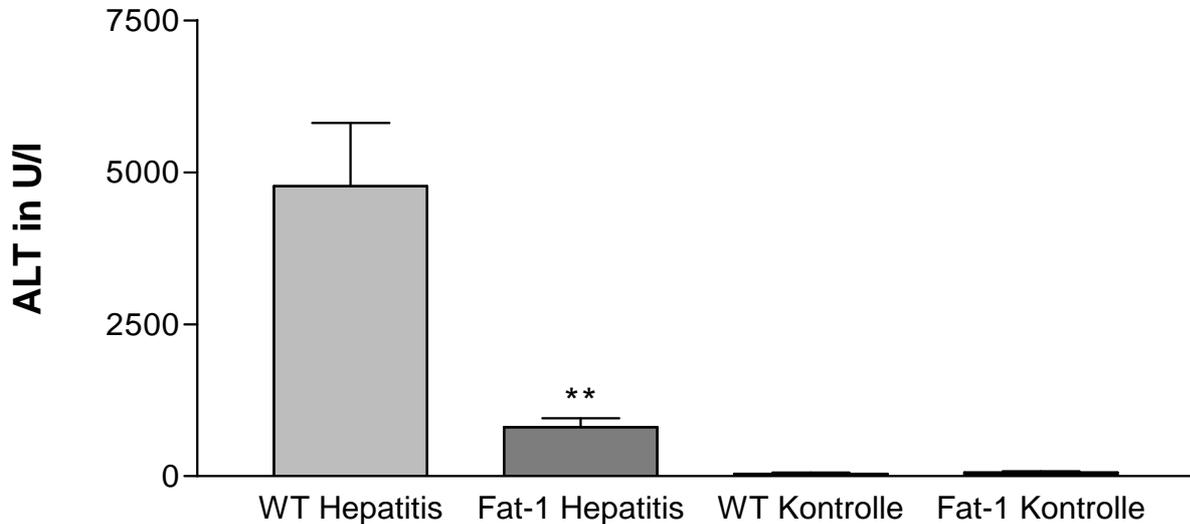


Abbildung 4 Graphische Darstellung der ALT-Aktivität im Serum, 6 Stunden nach der Hepatitis-Induktion gemessen; ** $P < 0,01$ vs. Wildtyp (WT)-Hepatitis, $N=5$

Diesen Ergebnissen zufolge ist davon auszugehen, dass das Leberparenchym in Tieren der Fat-1-Gruppe weniger geschädigt wurde als das der Wildtyp-Tiere.

4.3 Darstellung der morphologischen Veränderungen in der Leber anhand von Lichtmikroskopie und dem modifizierten HAI Score sowie die Beurteilung der Apoptosen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Neben der Bestimmung der ALT im Serum dient die histologische Untersuchung des Lebergewebes als zusätzlicher Parameter, um die Art und Schwere der morphologischen Veränderungen im Lebergewebe zu beurteilen. Die Proben wurden 6 Stunden nach der D-GaIN/LPS-Behandlung gewonnen, wie unter 2.5 beschrieben weiter behandelt und ausgewertet.

Bei den Kontrolltieren wurde in der lichtmikroskopischen Betrachtung sowohl in Wildtyp- als auch Fat-1-Mäusen die vorhandene Integrität der Leberzellen beobachtet. Hier konnten keine morphologischen Veränderungen in der Leber festgestellt werden (Abbildung 5).

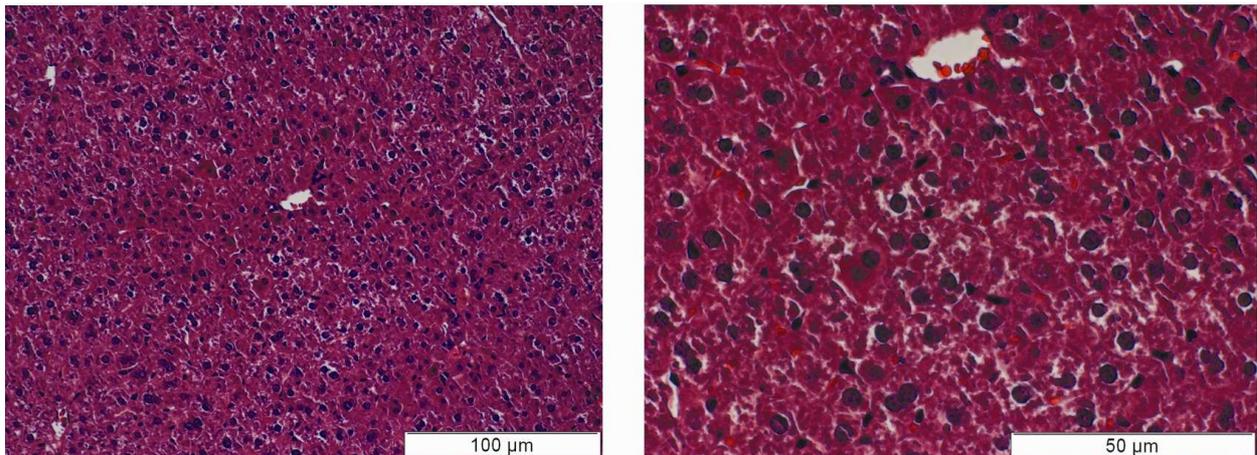


Abbildung 5 *Übersichtsaufnahme und Vergrößerung eines repräsentativen WT-Kontrolltieres*

Tiere vom Wildtyp, die mit D-GaIN/LPS behandelt wurden, zeigten in den HE-Schnitten unter dem Lichtmikroskop 6 Stunden nach der Injektion Zeichen für hepatitisstypische histopathologische Veränderungen.

Wie in Abbildung 6 erkennbar ist, wiesen Leberzellen der Wildtyp-Mäuse zahlreiche Kernpyknosen auf, bei denen das Chromatin im Zellkern kondensiert ist. Die Kerne waren dadurch verstärkt anfärbbar und hyperchromatisch. Des Weiteren sah man etliche Zellen mit deutlicher Karyorrhexis. Diese Kerne sollten im weiteren Verlauf der Apoptose lysieren. Typisch für nekrotische Veränderungen war die sichtbar verstärkte Eosinophilie des Zytoplasmas. Das entzündete Lebergewebe zeigte außerdem vermehrt rote Blutkörperchen (Hämorrhagie).

Im Vergleich zu den deutlich sichtbaren morphologischen Veränderungen in den D-GaIN/LPS-behandelten Wildtyp-Tieren zeigten Fat-1-Mäuse ein insgesamt erheblich unauffälligeres Bild hepatitisstypischer Veränderungen im Lebergewebe. Die Hepatozyten der transgenen Tiere schienen weitgehend intakt zu sein (Abbildung 7).

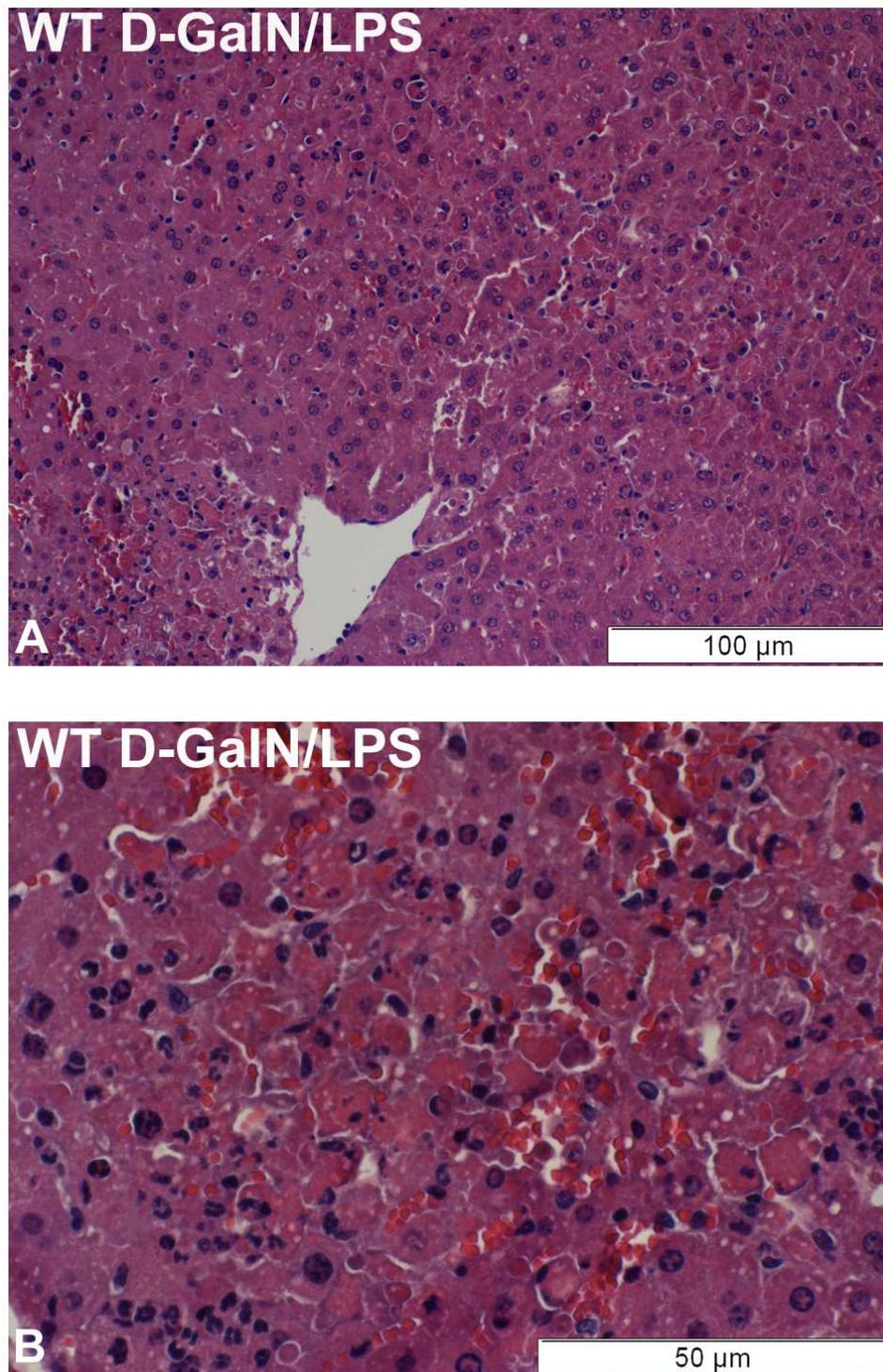


Abbildung 6 Lichtmikroskopische Aufnahmen von einer repräsentativen D-GalN/LPS-behandelten Wildtyp-Maus (A und B) 6 Stunden nach der Hepatitis-Induktion in Übersicht und Vergrößerung

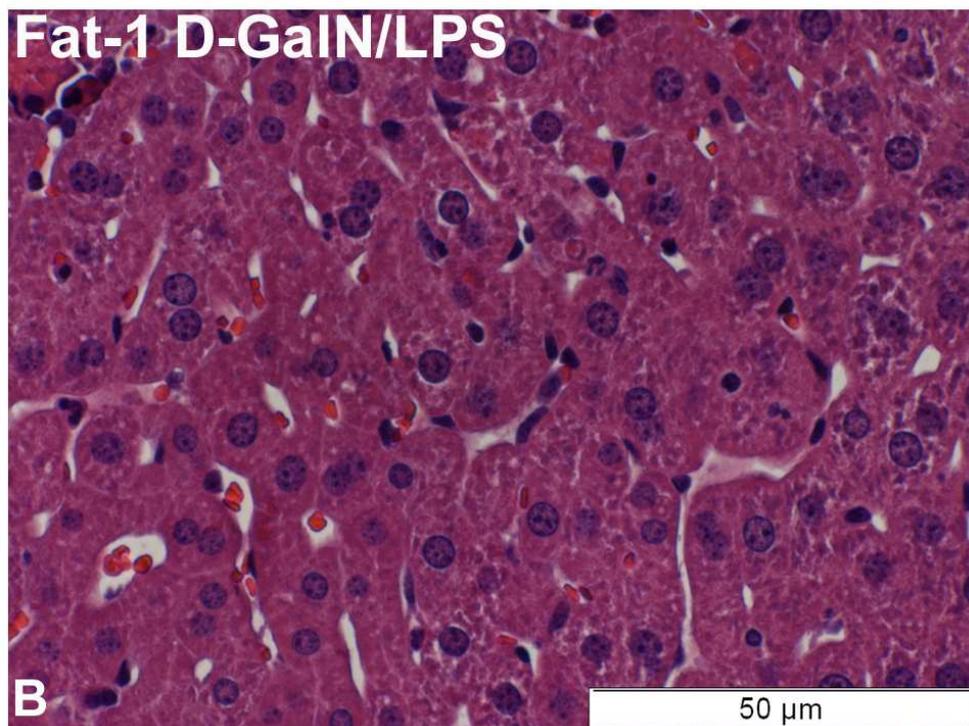
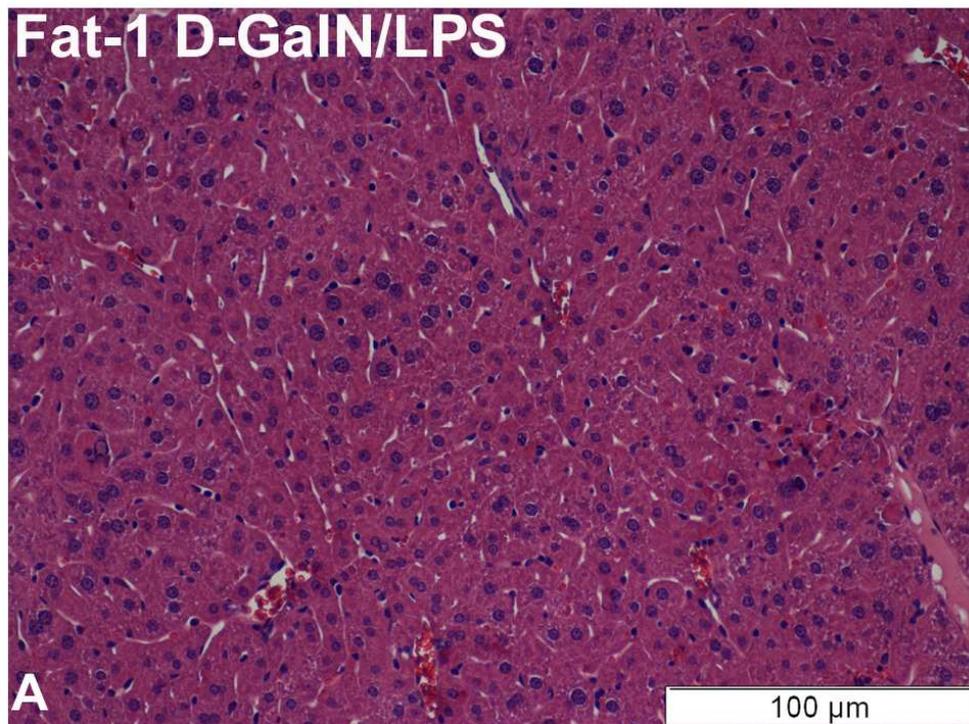


Abbildung 7 Lichtmikroskopische Aufnahmen von einer repräsentativen D-GaIN/LPS-behandelten Fat-1-Maus (A und B) 6 Stunden nach der Hepatitis-Induktion in Übersicht und Vergrößerung

Kriterium	Wildtyp-Hepatitis	Fat-1-Hepatitis
A	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
B	3.0 ± 0.3	1.2 ± 0.5*
C	4.0 ± 0.0	2.6 ± 0.4**
D	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Total HAI/18	7.8 ± 0.4	4.8 ± 1.1*

Tabelle 5 Grad der Leberschädigung 6 Stunden nach der D-GaIN/LPS-Injektion, durch den modifizierten Hepatitis-Aktivitäts-Index (HAI) bestimmt;

**P<0.01 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, N=5; *P<0.05 vs. Wildtyp Hepatitis-Gruppe, N=5

Wie in Tabelle 5 zu erkennen ist, manifestierte sich die D-GaIN/LPS-induzierte akute Hepatitis in den Versuchstieren beider Gruppen vor allem durch konfluierende Nekrosen (B) als auch durch fokale lytische Nekrosen, Apoptosen und fokale (intraalobuläre) Entzündung (C). In diesen Kriterien waren auch die auffälligsten Unterschiede zwischen beiden Hepatitis-Versuchsgruppengruppen zu finden, wobei die pathologischen Veränderungen in der Leber auffällig zu Gunsten der Fat-1-Tiere abnahmen (für C: WT 4,0±0, N=5; Fat-1 2,6± 0,4**, N=5; **P<0,01). Auch im Gesamt-HAI wiesen Fat-1-Tiere demnach signifikant geringere Schäden am Lebergewebe (4,8 ± 1,1*, N=5, *P<0,05 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe) als die Tiere vom Wildtyp (7,8 ± 0,4, N=5) auf.

Periportale bzw. periseptale Leberzellnekrosen (A) waren nur vereinzelt zu finden. Die Anzahl der portalen Entzündungszellen (D) fiel ebenfalls niedrig aus. Aufgrund des kurzen Versuchszeitraumes (6 Stunden) wurden fibrotische Veränderungen im Lebergewebe nicht in die Auswertung einbezogen.

Die Eindrücke aus den HE-Färbungen wurden durch die DAPI-Färbungen der Zellkerne und ihre Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop bestätigt. Abbildung 8 zeigt die Kerne zweier repräsentativer Versuchstiere. Auffällig ist hierbei die eindeutige Kondensation der DNA und die Auflösung der Kernmembran in Wildtyp-Tieren. Tiere der Fat-1-Gruppe zeigten statistisch signifikant weniger Apoptosen mit einer sichtbar intakten Integrität des Zellkerns in vielen Hepatozyten.

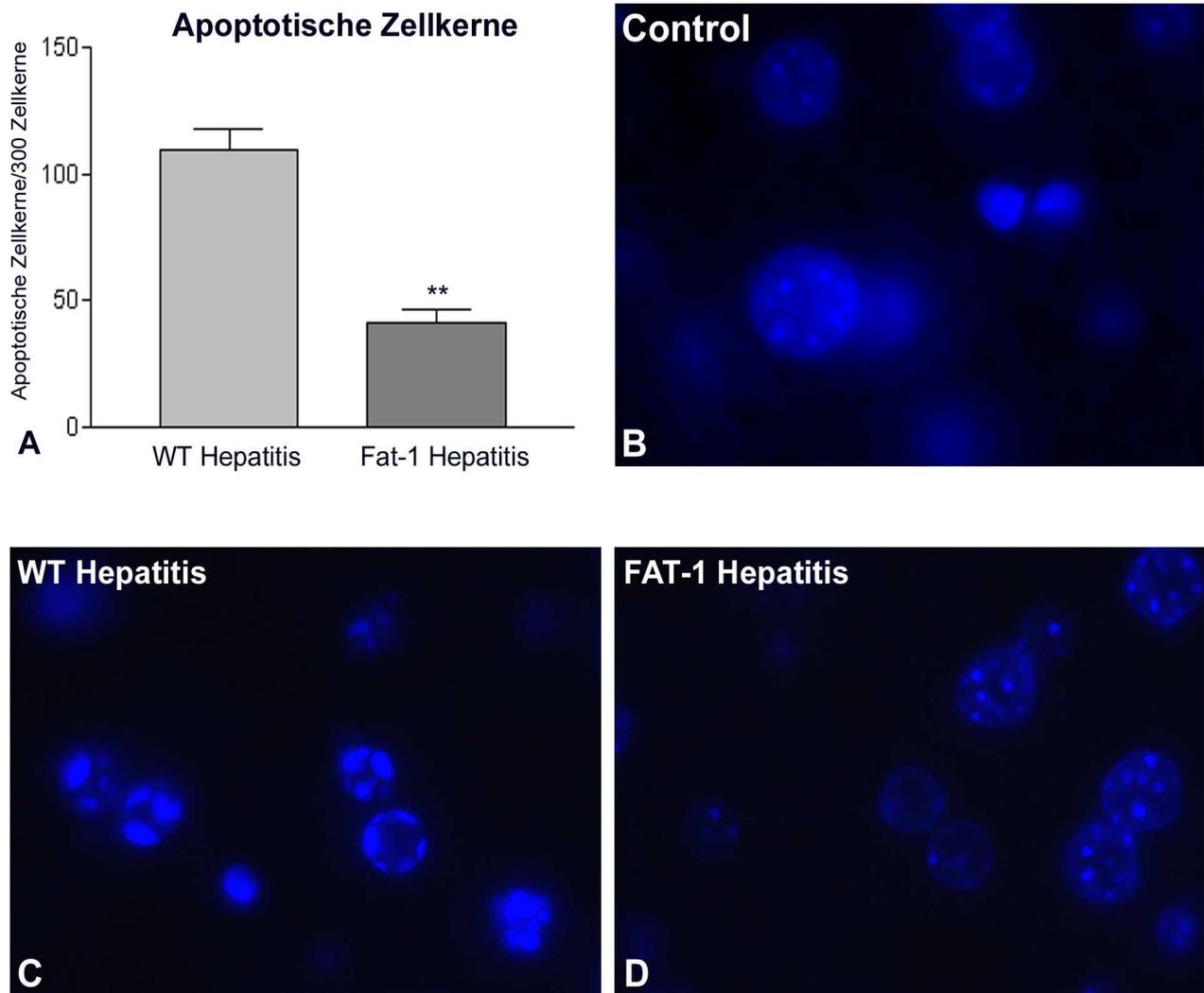


Abbildung 8 (A) Statistische Auswertung der Apoptosezahl im Lebergewebe von WT- und Fat-1-Hepatitis-Mäusen. (B-D) DAPI-Färbungen von Leberproben und Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie zur Verdeutlichung der typischen Merkmale apoptotischer Zellen (B) WT-Kontroll-Tier ohne Zeichen von Apoptose; (C) WT-Hepatitis-Tier mit deutlich sichtbaren apoptotischen Veränderungen (kondensiertes Chromatin und Auflösung der Kernmembran); (D) Fat-1-Hepatitis-Maus mit intakten Zellkernen. 100fache Vergrößerung

** $P < 0,01$ vs. D-GalN/LPS behandelte Wildtyp-Tiere $N = 3$

4.4 Ergebnisse des TNF- α -Gehaltes im Plasma und in der Leber

Sowohl bei der ALT-Bestimmung im Serum als auch in der histologischen Untersuchung des Lebergewebes zeigten Fat-1-Mäuse eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der D-GaIN/LPS Behandlung. Daraus ergibt sich die Frage, ob auch TNF- α , einer der wichtigsten pro-inflammatorischen Mediatoren bei einer akuten Hepatitis [6,7,55], in entsprechender Weise verändert wurde.

Im D-GaIN/LPS-Modell ist die Freisetzung von TNF- α aus aktivierten Kupffer Zellen der entscheidende Stimulus für die frühe Unterhaltung der Entzündung und Induktion von Apoptose in den Hepatozyten [6,59,60].

4.4.1 Ergebnisse des mittels ELISA analysierten TNF- α -Gehaltes im Plasma

Den systemischen TNF- α -Gehalt im Blut 90 min nach der Injektion von D-GaIN/LPS zu messen, hat sich als sinnvoll herausgestellt, weil die systemische TNF- α -Konzentration zu diesem Zeitpunkt ihren Peak erreicht [55].

Die Blutproben wurden aus der Schwanzvene entnommen und wie in 2.6.2 beschrieben aufgearbeitet und gemessen. Tabelle 5 und Abbildung 9 stellen die Messergebnisse zusammenfassend dar.

Gruppe	TNF- α -Konzentration in pg/ml
Fat-1-Hepatitis	455,5 \pm 145,1 N = 4*
WT-Hepatitis	2216 \pm 684,6 N = 4
Fat-1-Kontrolle	43,70 \pm 29,89 N = 3
WT- Kontrolle	39,28 \pm 15,83 N = 2

*Tabelle 6 Vergleich der TNF- α -Konzentrationen im Plasma, mittels ELISA 90 min nach der Hepatitis-Induktion gemessen, *P<0,05 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, N=4*

Aus Tabelle 6 und Abbildung 9 geht hervor, dass Tiere der Wildtyp-Gruppe (2216 \pm 684,6 N=4) signifikant höhere TNF- α -Konzentrationen im Plasma aufweisen als Fat-1-Hepatitis-Tiere (455,5 \pm 145,1 N=4, *P<0,05 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe). Damit konnte gezeigt werden, dass

die reduzierte ALT-Aktivität im Serum und die geringen morphologischen Veränderungen in der Leber von Fat-1-Mäusen mit einer Abnahme von systemischen TNF- α einhergehen.

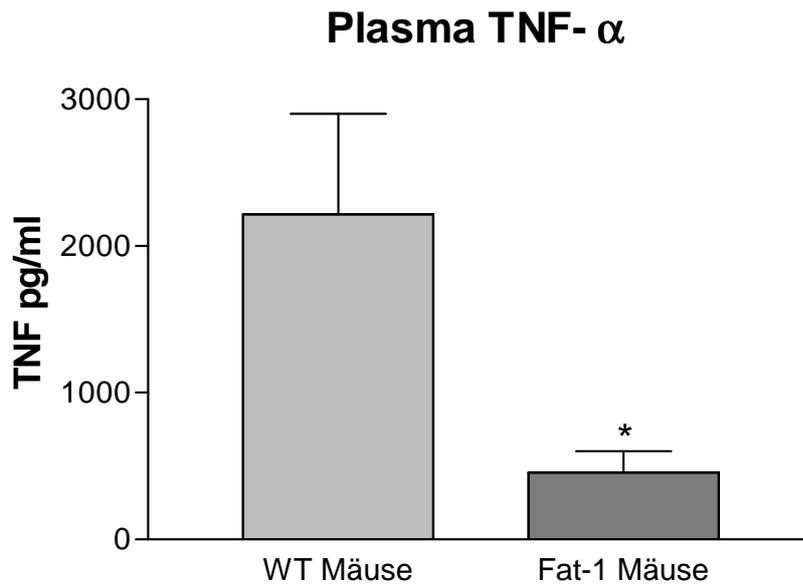


Abbildung 9 Graphische Darstellung der TNF- α -Konzentrationen im Plasma in D-GaIN/LPS-behandelten Wildtyp- und Fat-1-Tieren 90 min nach der Hepatitis-Induktion

**P < 0,05 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe; N=4*

In den Kontrollgruppen waren die TNF-Konzentrationen deutlich niedriger als in den Versuchsgruppen. Es gab keine erkennbaren Unterschiede im TNF-Gehalt zwischen den Kontrolltieren mit Wildtyp- und denen mit Fat-1-Abstammung (Tabelle 5).

4.4.2 Ergebnisse der mittels Echtzeit RT-PCR analysierten intrahepatischen TNF- α mRNA-Expression

Neben der systemischen TNF- α -Konzentration im Plasma wurde in der vorliegenden Arbeit die intrahepatische TNF-Konzentration ermittelt. Dazu wurde 6 Stunden nach der D-GaIN/LPS-Injektion eine Gewebeprobe der Leber entnommen und wie in 2.7.2 beschrieben analysiert.

Die Ergebnisse der Echtzeit RT-PCR sind in der Abbildung 10 graphisch dargestellt.

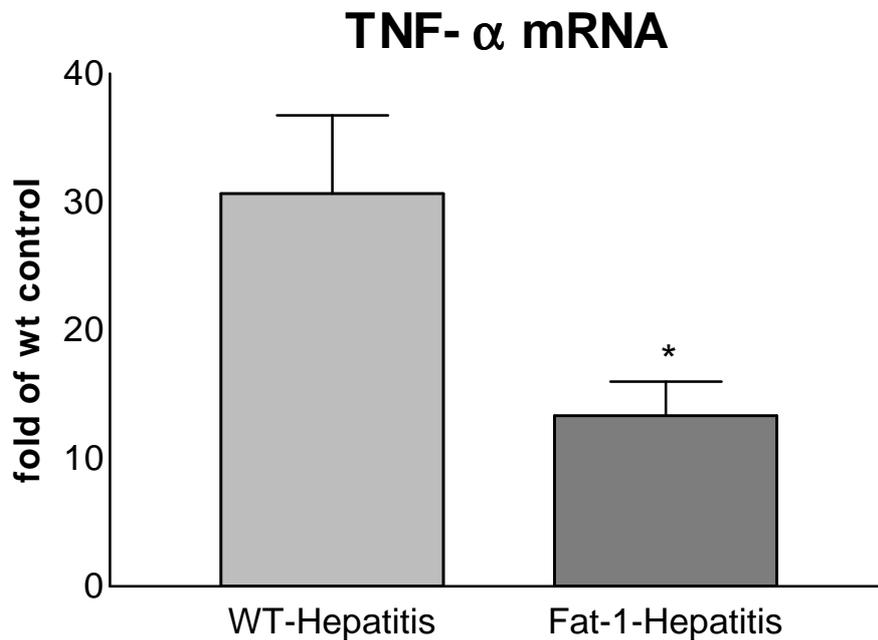


Abbildung 10 Vergleich der mRNA-Expression von TNF- α in der Leber 6 Stunden nach der Hepatitis-Induktion, mittels Echtzeit RT-PCR analysiert

Die Daten sind als x-fache Expression im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren angegeben.

**P<0,05 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, N=5*

6 Stunden nach der Hepatitisinduktion durch D-GaIN/LPS fand man in den Leberproben von Fat-1- und Wildtyp-Tieren signifikante Unterschiede in der TNF mRNA-Expression im Verhältnis zur mRNA-Expression des HkG GAP-DH (P<0,05 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, N=5). Wie auch bei der Plasma TNF- α -Konzentration wiesen Fat-1-Mäuse (13,31 \pm 2,68, -fold induction, N=5) in dieser Messung deutliche niedrigere Werte als Wildtyp-Mäuse (30.65 \pm 6.09, -fold induction, N=5) auf.

4.5 Ergebnisse der mittels Echtzeit RT-PCR analysierten mRNA-Expressionen der Zytokine IL-6, IL-1 β und IFN- γ

Wie eingangs berichtet, sind neben TNF- α auch die Zytokine Interleukin-1 β , Interleuin-6 und Interferon- γ als wichtige Entzündungsmediatoren im D-GaIN/LPS-Modell beteiligt [13,55,59,60]. Zur ihrer Quantifizierung wurde die Expression der mRNA des jeweiligen Zytokins im Lebergewebe 6 Stunden nach der D-GaIN/LPS-Injektion wie unter 2.7.2 beschrieben analysiert.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abbildungen 11 bis 13 zusammenfassend graphisch dargestellt. Die erhaltenen Messwerte geben das Verhältnis des analysierten Zytokins zum HkG GAP-DH wieder und wurden mit der mRNA-Expression von Wildtyp-Kontrolltieren verglichen.

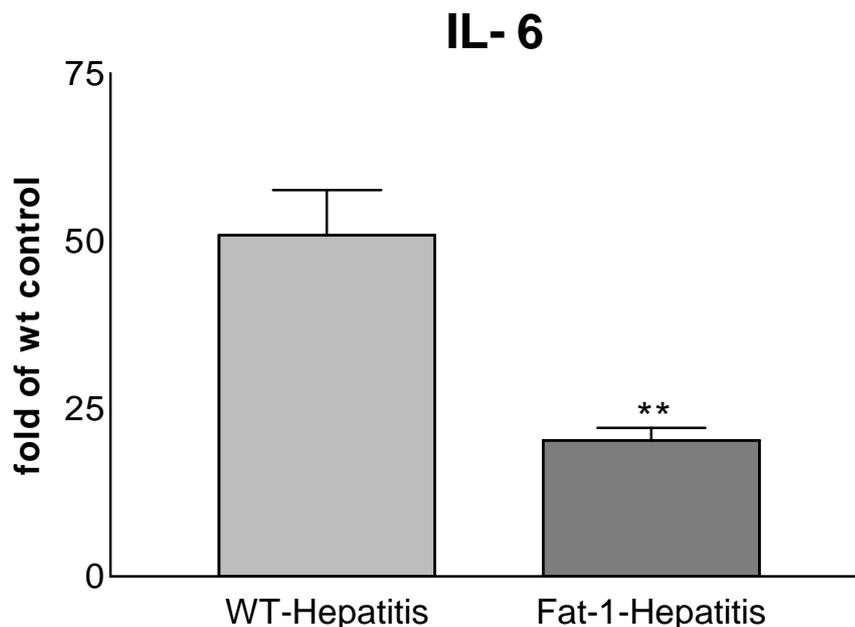


Abbildung 11 Vergleich der mRNA-Expression von IL-6 in der Leber, mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR in Wildtyp- und Fat-1-Hepatitis-Tieren analysiert

Die Daten sind als x-fache Expression im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren angegeben.

** $P < 0,01$ vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, $N = 4$

In unserer Analyse zeigten Fat-1-Mäuse auch deutlich niedrigere Gehalte für die Zytokine IL-6, IL-1 β und IFN- γ in der Leber, verglichen mit Wildtyp-Tieren während des akuten Entzündungsgeschehens (Abb.: 11 bis 13).

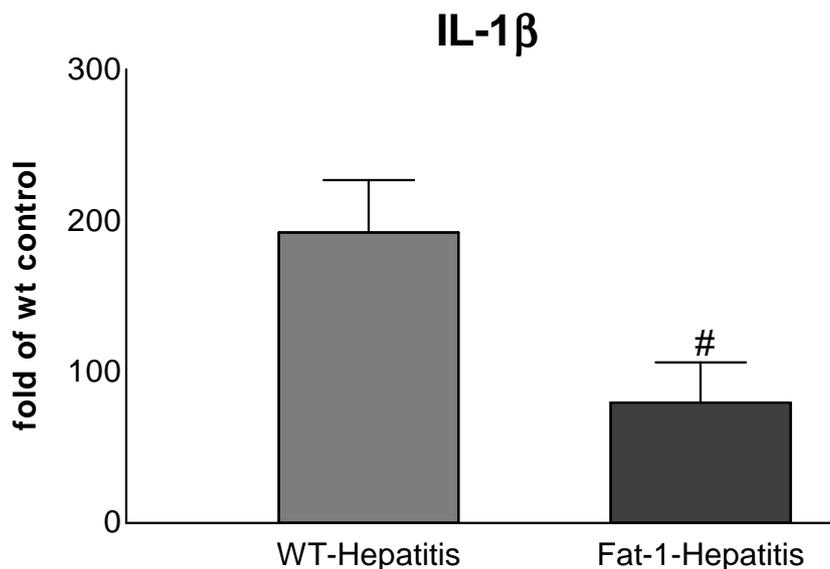


Abbildung 12 Vergleich der mRNA-Expression von IL-1 β in der Leber mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR in Wildtyp- und Fat-1-Hepatitis-Tieren

Die Daten sind als x-fache Expression im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren angegeben.

P<0,05 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, N=5

Aus den Abbildungen 11 bis 13 wird ersichtlich, dass sowohl Wildtyp-Hepatitis-Tiere als auch Fat-1-Hepatitis-Tiere 6 Stunden nach der Hepatitis-Induktion höhere Genexpressionsraten der gemessenen Zytokine aufwiesen als die gesunde Wildtyp-Kontrollgruppe. Es bestand daher eine erhöhte Induktion dieser Gene während der D-GaIN/LPS-induzierten Hepatitis.

In Abbildung 11 ist die Konzentration von IL-6 mRNA in der Leber 6 Stunden nach der Injektion von D-GaIN/LPS dargestellt. Es ist zu sehen, dass Wildtyp-Tiere ($50,90 \pm 6,749$, N=4) deutlich höhere Konzentrationen an IL-6 mRNA in der Leber hatten als die transgenen Fat-1-Tiere ($20,37 \pm 1,794$, P<0,01 vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, N=4).

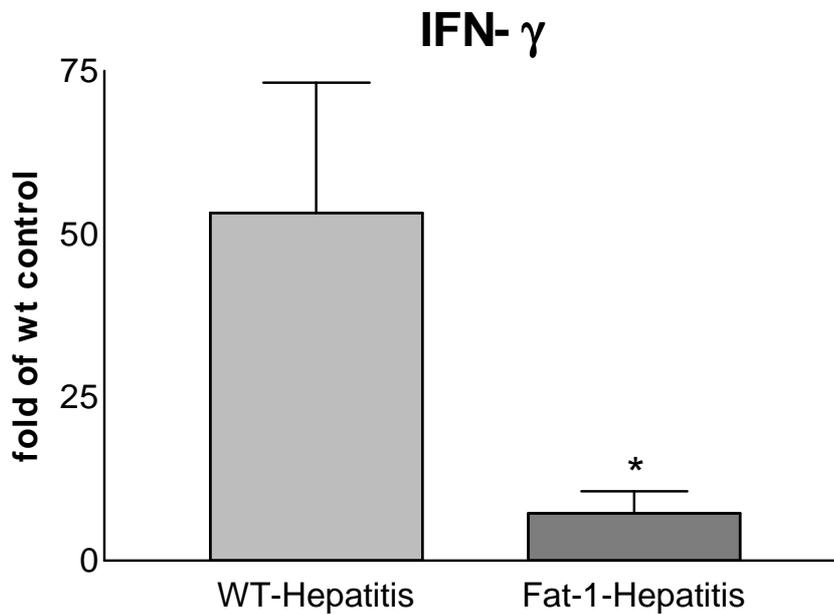


Abbildung 13 Vergleich der mRNA-Expression von *IFN- γ* in der Leber, mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR in Wildtyp- und *Fat-1*-Hepatitis-Tieren analysiert

Die Daten sind als *x*-fache Expression im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren angegeben.

* $P < 0,05$ vs. Wildtyp-Hepatitis-Gruppe, $N=4$ für *Fat-1*-Hepatitis; $N=5$ für WT-Hepatitis

Die Untersuchungen zeigten, dass auch die Genexpression für das Zytokin IL-1 β in den Omega-3-reichen *Fat-1*-Tieren signifikant niedriger war ($79,51 \pm 26,79$, $P < 0,05$ vs. Wildtyp-Hepatitis-Mäuse, $N = 5$) als in den Tieren mit Wildtyp-Hintergrund ($192,4 \pm 34,57$, $N = 5$) (Abb. 12).

Für das von NK-Zellen produzierte pro-inflammatorische Zytokin *IFN- γ* konnten in Wildtyp-Hepatitis-Tieren ebenfalls signifikant höhere Expressionen als in den *Fat-1*-Hepatitis-Tieren nachgewiesen werden.