

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Chirurgie  
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Einfluss des selektiven Inhibitors der c-Jun N-terminalen  
Kinase D-JNK-1 nach Hämorrhagie/Reperfusionstrauma  
bei chronisch ethyltoxisch vorgeschädigter Leber**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Jenny Vanessa Roxane Weber

aus Schorndorf

Frankfurt am Main, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Borna Relja
Korreferent:	Prof. Dr. Waldemar Schreiner
Tag der mündlichen Prüfung:	16.08.2022

### Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	01
1.1 Ziel der Arbeit.....	01
1.2 Traumageschehen und Alkoholmissbrauch.....	02
1.3 Ethyltoxischer Leberschaden.....	03
1.4 Alkoholstoffwechsel und Pathogenese des ethyltoxischen Leberschadens.....	07
1.5 Hämorrhagischer Schock.....	10
1.6 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks und des Hämorrhagie-/ Reperfusionstraumas.....	11
1.7 Auswirkungen der Hämorrhagie/Reperfusion auf die Leber.....	15
1.8 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B.....	17
1.9 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und Aktivator Protein-1 (AP-1).....	19
1.10 D-JNKI-1, ein spezifischer Inhibitor der c-Jun N-terminalen Kinase.....	21
1.11 Fragestellung.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte und Materialien.....	22
2.1.2 Chemikalien.....	26
2.1.3 Antikörper, Kits und Testsubstanzen.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Experimentelles Protokoll.....	29
2.2.1.1 Modell der ethyltoxischen Fettleber / des chronischen ethyltoxischen Leberschadens am Versuchstier Maus durch Lieber-DeCarli Diät-Fütterung.....	30
2.2.1.2 Herstellung der Lieber-DeCarli Diät.....	31

2.2.1.3	Chronische Alkoholfütterung der Tiere - Paarfütterung	31
2.2.1.4	Modell des Hämorrhagischen Schocks/Reperfusion am Versuchstier Maus - Operative Prozedur	33
2.2.1.4.1	Katheterisierung der <i>Aa. femorales</i>	33
2.2.1.4.2	Durchführung des hämorrhagischen Schocks/ Reperfusion nach erfolgter Katheterisierung	34
2.2.1.4.3	Vorgehen bei der Kontrollgruppe	36
2.2.1.4.4	Organentnahme und Probenkonservierung	36
2.2.2	Kontrollparameter des Versuchsablaufes	37
2.2.2.1	Hämodynamik des Hämorrhagischen Schocks	37
2.2.2.2	<i>Liver to body weight</i> Ratio (LBR)	37
2.2.3	Nachweis von Organschäden	37
2.2.3.1	Bestimmung der AST-/ALT- und CK -Konzentrationen im Plasma	37
2.2.3.2	Gewebeaufbereitung für histologische und immunhistochemische Färbungen	38
2.2.3.3	Darstellung der Lebermorphologie mit der Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbung	39
2.2.3.3.1	Entparaffinierung	39
2.2.3.3.2	Kern-Plasma-Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	39
2.2.3.3.3	Eindecken der Schnitte	40
2.2.3.3.4	Auswertung der Färbung	40
2.2.4	Nachweis eines inflammatorischen Geschehens	40
2.2.4.1	Bestimmung der Zytokin-Level im Serum (IL-6, TNF- $\alpha$ )	40
2.2.4.2	Bestimmung der Zytokin-Level im Lebergewebe	41
2.2.4.2.1	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	41
2.2.5	Untersuchung der Transkriptionsfaktoren c-Jun/NF- $\kappa$ B	42
2.2.5.1	Proteinisolierung aus Lebergewebe	42
2.2.5.1.1	Proteinextraktion aus Gewebeproben	42
2.2.5.1.2	Proteinquantifizierung	43
2.2.5.2	Quantifizierung der (phospho-) c-Jun/ NF- $\kappa$ B Expression mittels Western Blot	43
2.2.5.2.1	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Proteinauftrennung	43

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.5.2.2	Western-Hybridisierung (Western Blot)	45
2.2.5.2.3	Antikörperhybridisierung	46
2.2.5.2.4	Chemolumineszenz	48
2.2.5.2.5	Entfernung von primären Antikörpern ( <i>Stripping</i> )	48
2.2.5.3	Nachweis von GFP Aktivierung mittels immunhistologischer Färbung	49
2.2.5.3.1	Durchführung der immunhistochemischen GFP Färbung	49
2.2.5.3.2	Auswertung der Färbung	49
2.2.6	Die semi-quantitative <i>realtime</i> -Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	50
2.2.7	Statistische Analyse	51
3.	Ergebnisse	52
3.1	Darstellung der pathologischen Veränderung durch chronische Ethanolfütterung	52
3.1.1	<i>Liver to body weight</i> Ratio	52
3.1.2	Histopathologische Abbildung der ethanolinduzierten Fettleber	52
3.2.	Darstellung des hämodynamischen Verlaufes während Hämorrhagie/Reperfusion bzw. Kontroll-Operation	53
3.2.1	<i>Shed blood volume</i>	53
3.2.2	Mittlerer arterieller Druck	54
3.3	Organschädigung nach Hämorrhagie/Reperfusion bei chronisch ethanolgeschädigter Leber und die Beeinflussung durch D-JNK-1-Gabe	55
3.3.1	Analyse der Marker für Zellschäden im Serum (AST / ALT und LDH)	55
3.3.2	Darstellung der histopathologischen Veränderungen in der HE-Färbung	58
3.4	Untersuchung der systemischen und hepatischen Inflammationsreaktion	60
3.4.1	Systemische pro-inflammatorische Veränderungen nach H/R am Beispiel von Interleukin (IL)-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$	60
3.4.2	Die lokale Immunreaktion - Analyse des hepatischen	

## Inhaltsverzeichnis

---

Interleukin-6.....	62
3.4.3 Die lokale Immunreaktion – Analyse der hepatischen Genexpression.....	62
3.5 Nachweis der Transkriptionsfaktoren c-Jun und NF-κB bei chronisch ethanolgeschädigter Leber und die Beeinflussung durch D-JNK-1-Gabe.....	64
3.5.1 Analyse von c-Jun und NF-κB (sowie pc-Jun und pNF-κB) im Western blot.....	64
3.5.2 Darstellung der NF-κB Aktivierung durch GFP-Immunhistologie.....	65
4. Diskussion.....	67
4.1 Auswirkungen von chronischer Ethanol­fütterung und Hämorrhagie/Reperfusionstrauma auf die Leber.....	67
4.2 Inflammationsreaktion nach Hämorrhagie/Reperfusionstrauma und durch chronische Ethanol­aufnahme ausgelösten Leberschaden.....	69
4.3 Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κB.....	71
4.4 Die Rolle von c-Jun.....	72
4.5 Die Gabe von D-JNK-1 vermindert den Zell- und Lebergewebeschaden sowie die Zytokinfreisetzung nach Hämorrhagie/Reperfusion.....	73
4.6 Die Gabe von D-JNK-1 führt zu keiner signifikanten Verbesserung nach Hämorrhagie/Reperfusion bei Vorliegen eines durch chronische ethanol- haltige Fütterung ausgelösten Leberschadens.....	75
4.7 Schlussfolgerung.....	76
5. Zusammenfassung.....	77
6. Summary.....	79
Literaturverzeichnis.....	80
Danksagung.....	90
Schriftliche Erklärung.....	91
Lebenslauf.....	92

### Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** | Darstellung der *Liver to body weight* Ratio in Kontrolldiät (ctrl)- und Lieber-DeCarli Diät gefütterten Alkoholtieren (EtOH)
- Abb. 2** | Repräsentative Darstellung der *Steatosis hepatis* durch Lieber-DeCarli Diät-Fütterung bzw. Kontrolldiät-Fütterung
- Abb. 3** | Darstellung des entnommenen maximalen Blutvolumens für die Schockinduktion
- Abb. 4** | Darstellung der mittleren arteriellen Blutdruckwerte (MAP) vor H/R bzw. sham, in 5minütigem Abstand während der 90 Minuten H/R bzw. sham-Phase und nach Reperfusion/Abschluss
- Abb. 5** | Abbildung der Serum-Enzymwerte
- Abb. 6** | Repräsentative Darstellung des Ausmaßes der Organschädigung 2 h nach Sham-Operation mit Kontrolldiät-Fütterung, sham-Operation mit Ethanol-Diät-Fütterung, H/R mit Kontrolldiät-Fütterung, beziehungsweise H/R mit Ethanol-Diät-Fütterung mittels HE-Färbung
- Abb. 7** | Plasma IL-6 und TNF- $\alpha$  Spiegel nach Hämorrhagie und Reperfusion (H/R) in paar-gefütterten Mäusen mit Ethanol- (EtOH) oder Kontrolldiät (ctrl)
- Abb. 8** | Hepatische ICAM-1 und MMP9 Genexpression 2 h nach Reperfusion in paar-gefütterten Mäusen mit Ethanol- (EtOH) oder Kontrolldiät (ctrl)
- Abb. 9** | Darstellung von c-JUN, NF- $\kappa$ B p65 und  $\beta$ -Aktin mittels Western Blot

### Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	Verwendete Geräte und Hersteller; alphabetisch geordnet
<b>Tab. 2</b>	Verwendete Materialien und Hersteller; alphabetisch geordnet
<b>Tab. 3</b>	Verwendete Chemikalien und Hersteller; alphabetisch geordnet
<b>Tab. 4</b>	Verwendete Antikörper, Kits, Substanzen und Bezugsquellen; alphabetisch geordnet
<b>Tab. 5</b>	Übersicht der Gruppenaufteilung
<b>Tab. 6</b>	Verwendete Materialien für die Herstellung der Flüssigdiät
<b>Tab. 7</b>	Fütterungsregime über 4 Wochen, Alkoholgehalt der Nahrung in % (v/v0)
<b>Tab. 8</b>	Schema der Alkoholreihe (gültig für alle Färbungen)
<b>Tab. 9</b>	Zusammensetzung der Lösung zur Zelllyse
<b>Tab. 10</b>	Zusammensetzung der Elektrophoresegele
<b>Tab. 11</b>	Zusammensetzung der Lösungen zur Proteinauftrennung
<b>Tab. 12</b>	Verwendete Antikörper zur Western Blot-Analyse
<b>Tab. 13</b>	Pufferlösungen zur Proteindarstellung und ihre Zusammensetzungen
<b>Tab. 14</b>	Verwendete Primer
<b>Tab. 15</b>	<i>Liver to body weight</i> Ratio
<b>Tab. 16</b>	Entnommene Blutvolumina – <i>shed blood volume</i>



### Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
Aa.	<i>Arteriae</i>
ALD	<i>Alcoholic liver disease</i>
ALDH2	Acetaldehyddehydrogenase 2
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i> Test
AP-1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	<i>Adult respiratory distress syndrome</i>
AS	Aminosäuren
AST	Aspartat Aminotransferase
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BAC	<i>Blood alcohol concentration</i>
BAFF	<i>B cell-activating factor</i>
B-ATF	<i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i>
bidest.	Bidestilliert
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> = Rinderserumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CAGE	<i>C- cut down, A- annoying, G- guilty, E- eye opener – screening test</i>
CaSO <sub>4</sub>	Calciumsulfat
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDT	<i>carbohydrate deficient transferrin</i>
c-Fos	Proto-onkogen c-Fos
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ethanol
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX-2	Cyclooxygenase-2

## Abkürzungsverzeichnis

---

C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	Acetaldehyd
c-Jun	Proto-onkogen c-Jun
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
CPP	<i>cell permeable peptides</i>
c-Rel	Proto-onkogen c-Rel
ctrl	Kontrolle
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern molecules</i>
dest.	Destilliert
DHS eV.	Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen
D-JNK-1	JNK Inhibitor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM-IV	<i>diagnostic and statistical manual of mental disorders</i>
eGFP	<i>enhanced Green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
ERK 1-5	extrazellulär signalregulierten Kinasen 1-5
et al.	<i>et alii / et aliae</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>(fluorescence-activated cell sorting)</i> Durchflusszytometer
g	Gramm
G	Gauge
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
h	<i>(hour)</i> Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV Tat	<i>Human immunodeficiency virus type 1 trans-activator of transcription</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser

## Abkürzungsverzeichnis

---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HO·	Hydroxy-Radikal
H/R	Hämorrhagie/Reperfusion - <i>hemorrhage/resuscitation</i>
HSC	hepatische Sternzellen
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HTX	Hämatoxylin
IB-1	<i>islet brain 1</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
I.E.	Internationale Einheiten = I.U. <i>international units</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK	IκB-Kinase-komplex (α, β, γ)
IκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-1β	Interleukin-1β
IL1-R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.p.	intraperitoneal
JIP-1	<i>JNK-interacting protein 1</i>
JNK 1-3	c-JUN N-terminale Kinase 1-3
JunB	Transkriptionsfaktor JunB
JunD	Transkriptionsfaktor JunD
Km-Wert	Michaeliskonstante
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LBR	<i>Liver-to body-weight-ratio</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
L-JNK-1	L-Form des JNK-Inhibitors
LPS	Lipopolysaccharide

## Abkürzungsverzeichnis

---

mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase = MAP-Kinase
MAPKK	MAPK-Kinase oder auch MEK
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase oder auch MEKK
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MCV	Mittleres corpuskuläres Volumen
MEOS	Mikrosomale ethanoxidierende System
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP-9	Matrix Metallopeptidase 9
MOF	<i>Multiple organ failure</i>
MOV	Multiorganversagen
mRNA	<i>(messenger)</i> Boten Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Gruppengröße
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinukleotid oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid reduzierte Form
NADP <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oxidierte Form
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat reduzierte Form
NEMO	IKK $\gamma$

## Abkürzungsverzeichnis

---

NF-κB	<i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-anion
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
p65	= Rel A = Transkriptionsfaktor p65 /nuclear factor NF-kappa-B p65 Untereinheit
p50	= p105 = Precursor Proteine NF-κB 1
p52	= p100 = Precursor Proteine NF-κB 2
p100	= p52 = Precursor Proteine NF-κB 2
p105	= p50 = Precursor Proteine NF-κB 1
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pc-Jun	Phospho c-JUN
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PMN	<i>Polymorphonuclear neutrophil</i>
PMNL	polymorphonukleären Leukozyten
pNF-κB	Phospho NF-κB
pp65	Phospho p65
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
Rel A	= p65 = Transkriptionsfaktor p65 /nuclear factor NF-kappa-B p65 Untereinheit
Rel B	Transkriptionsfaktor Rel B /nuclear factor NF-kappa-B Untereinheit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	( <i>rounds per minute</i> ) Umdrehungen pro Minute
RR	Blutdruck
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## Abkürzungsverzeichnis

---

sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
sham	Sham-Operation
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrom</i>
SMAST	<i>Short Michigan Alcohol Screening Test</i>
SP600126	Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-1
SR	„ <i>super repressor</i> “
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR-4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNFR	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor</i>
Tris	Trishydroxymethanlaminomethan
U/L	<i>Unit/Liter</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
V.	<i>Vena</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1= CD106</i>
veh	<i>Vehicel</i>
VLDL	<i>very low density lipoproteinen</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
Zn	Zink

### 1. Einleitung

#### 1.1 Ziel der Arbeit

Die Behandlung eines hämorrhagischen Schocks ist im heutigen Europa durch eine adäquate Erstversorgung überwiegend aufgrund der hohen Dichte an Krankenhäusern gewährleistet. Dennoch kommt es trotz der ausgezeichneten Versorgungsmöglichkeiten häufig nach der Reperfusion der Patient\*innen über das sogenannte systemische inflammatorische *response*-Syndrom (SIRS) zu einem Multiorganversagen (MOV), welches nicht selten einen tödlichen Ausgang hat. Diese Problematik fordert daher intensive Forschung bzgl. alternativer oder ergänzender Therapiemöglichkeiten in diesem Bereich. Forschungsarbeiten von anderen Arbeitsgruppen sowie eigene Vorarbeiten haben gezeigt, dass das zellgängige, proteaseresistente Inhibitorprotein der c-Jun N-terminalen Kinase, D-JNK-1, einen Angriffspunkt zur Verbesserung des *Outcomes* und Verminderung von Organschäden nach Hämorrhagie- und Reperfusionstrauma, wie es bei Transplantationen, Ischämiegeschehen und hämorrhagischem Schock der Fall ist, darstellt. Dabei übt D-JNK-1 sowohl auf die systemische als auch auf die lokale Inflammationsreaktion eine hemmende Wirkung, welche durch das Hämorrhagie- und Reperfusionstrauma ausgelöst wird, und im klinischen Kontext zum SIRS oder MOV führt, aus.

Eine weitere Problematik der unfallchirurgischen Kliniken weltweit ist das häufige Vorliegen des Krankheitsbildes und der Auswirkungen einer chronisch ethyltoxischen Leberschädigung bei Traumapatient\*innen. Die Modulation der normalen physiologischen Abläufe des Organismus durch diese Erkrankung hat einen relevanten Einfluss auf das *Outcome* und die Therapie der betroffenen Patient\*innen, und verlangt nach einer interdisziplinären Zusammenarbeit verschiedener klinischer Disziplinen.

Dieser Arbeit wurde das Ziel gesetzt, die Auswirkungen des Hämorrhagie- und Reperfusionstraumas bei Vorliegen eines durch chronischen Ethanolkonsum ausgelösten Leberschadens, unter besonderer Beachtung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B genauer zu untersuchen, sowie die Einflüsse einer Hemmung der c-Jun N-

terminalen Kinase mittels D-JNKI-1 unter diesen Bedingungen in einem Tiermodell an Mäusen abzubilden.

### 1.2 Traumageschehen und Alkoholmissbrauch

Im Jahr 2017 gab es nach Angaben der Deutschen Hauptstelle für Suchtgefahren in Deutschland ca. 1,6 Millionen behandlungsbedürftige Alkoholabhängige und 1,4 Millionen Menschen mit einem Alkoholmissbrauch im Alter zwischen 18 und 64 Jahren<sup>1</sup>. Chronischer Alkoholmissbrauch führt, neben den bekannten Folgeschäden des Alkoholmissbrauches, nicht nur zu einer signifikant verschlechterten Morbidität und Mortalität nach einem erlittenen Polytrauma<sup>2,3</sup>, sondern auch zu viel häufigeren Unfällen mit schweren und multiplen lebensbedrohlichen Verletzungsfolgen in dieser Patient\*innengruppe<sup>3,4</sup>. Neben Verkehrsunfällen sind Stürze in der häuslichen Umgebung, „Freizeitunfälle“ oder auch seltener Unfälle im Arbeitsumfeld ein häufiger Verletzungsmechanismus<sup>5</sup>. Auch Verbrennungsunfälle, Beinahe-Ertrinken, gewalttätige Auseinandersetzungen und suizidale Handlungen treten vermehrt bei Alkoholmissbrauch auf. Besonders häufige durch Unfälle bedingte Verletzungsfolgen sind Schädelhirntraumen, jedoch auch Wirbelsäulen- und Verletzungen der unteren Extremität<sup>5</sup>. Die erhöhte Morbidität und Mortalität während der sich an das Trauma anschließenden Intensivtherapie resultiert dabei aus schwereren posttraumatischen Verläufen mit Entwicklung von SIRS, Sepsis und MODS und signifikant häufigerem Auftreten von Komplikationen (beispielsweise Pneumonie, Blutungs- und Gerinnungsstörungen, kardiale Komplikationen)<sup>2</sup>.

Spricht man von Alkoholmissbrauch im Zusammenhang mit Unfällen und Polytrauma, so ist es ein relevanter Unterschied, ob eine akute Alkoholintoxikation bei einer Person ohne chronischen Alkoholmissbrauch, wozu auch das sog. „*binge drinking*“<sup>6</sup> gezählt wird, oder ein chronischer Alkoholmissbrauch ggf. mit durch chronischen Alkoholkonsum bedingten Folgeschäden, besteht. So ist zwar das Patient\*innenkollektiv mit hohen Blutalkoholspiegeln bei einer akuten Alkoholintoxikation noch häufiger bei Unfällen mit einem Fahrzeug involviert als



das Patient\*innenkollektiv mit einem chronischen Alkoholmissbrauch oder mäßigem Blutalkoholspiegel<sup>7</sup>. Im Tiermodell zeigt es sich aber, dass eine akute Alkoholintoxikation ohne vorliegenden chronischen Alkoholmissbrauch im Rahmen von Trauma und Hämorrhagie sogar eine Abschwächung der posttraumatischen Inflammationsreaktion herbeiführen kann<sup>8-11</sup>. In zahlreichen klinischen, *in vivo* und *in vitro* Studien wurden die Auswirkungen von Alkohol untersucht, jedoch mit unterschiedlichsten Ergebnissen<sup>10,12-19</sup>. Dabei stehen sich Studien gegenüber mit erhöhter Mortalität, erhöhten Komplikationsraten und schlechteren *Outcome* Ergebnissen *versus* erniedrigter Mortalität, geringerem Organschaden und verbessertem Outcome. Als zugrundeliegende Mechanismen wird u.a. der Einfluss von Alkohol auf das Immunsystem, die post-traumatische Inflammation, die Gerinnung und den Säure-Base-Haushalt diskutiert.

### 1.3 Ethyltoxischer Leberschaden

Leberschädigungen infolge von übermäßigem Alkoholkonsum und Alkoholmissbrauch sind ein relevantes und weltweit verbreitetes Gesundheitsproblem. Die Statistiken der deutschen Hauptstelle für Suchtfragen (DHS eV.) belegen die große Rolle von Alkohol als Genuss und Suchtmittel. So betrug der pro-Kopfverbrauch an reinem Alkohol 2012 9,5 Liter<sup>9</sup>. Die Prävalenz alkoholbezogener Störungen nach DSM-IV bei Erwachsenen zwischen 18 und 64 Jahren betrug 4,7% bei Männern und 1,5% bei Frauen bezüglich der Diagnose Alkoholmissbrauch, bei der Diagnose Alkoholabhängigkeit betragen die Zahlen 4,8% in der Gruppe der Männer und 2,0% in der Gruppe der Frauen in Deutschland<sup>20</sup>. Diverse Studien haben sich mit der Entwicklung eines alkoholtoxischen Leberschadens (*alcoholic liver disease* = ALD) befasst, hier zeigt sich, dass die Entwicklung einer alkoholtoxischen Lebererkrankung von der Menge und der Dauer der Alkoholaufnahme abhängig ist. Es wurde unter anderem nachgewiesen, dass im Allgemeinen ein täglicher Konsum von 80-160 g Ethanol das Risiko einen alkoholtoxischen Leberschaden zu entwickeln um das Fünffache, ein Konsum von >160 g um das 25-fache, steigert<sup>21,22</sup>.

## Einleitung

---

Die Entwicklung eines alkoholtoxischen Leberschadens wird dabei von multiplen Faktoren individuell beeinflusst. Ein entscheidender Faktor ist beispielsweise das Geschlecht: so beträgt die Ethanol-dosis, welche eine signifikante Zunahme der Zirrhose-Inzidenz auslöst, bei Frauen 20 g, während es bei Männern 40 g sind. Weitere Untersuchungen belegen, dass Frauen auch anfälliger für die Entwicklung einer alkoholtoxischen Leberzirrhose sind<sup>22,23</sup>. Auch die ethnische Herkunft<sup>24</sup>, Fehl- und/oder Mangelernährung<sup>25</sup>, Übergewicht und Insulinresistenz<sup>26,27</sup>, virale Hepatitis<sup>28</sup>, Eisenüberlastung und Nikotinabusus<sup>29-31</sup> sind Faktoren, die die Entwicklung und das Fortschreiten der ALD beeinflussen. Nicht zuletzt spielen auch genetische Faktoren wie Polymorphismen von Genen, die in den Alkoholmetabolismus und die endotoxinvermittelte Ausschüttung von Zytokinen involviert sind, eine Rolle<sup>32</sup>.

Pathogenetisch umfasst der ethyltoxische Leberschaden (ALD) das gesamte Spektrum der Leberschäden von der Steatosis über Steatohepatitis und Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose, und bis zur Entwicklung eines hepatozellulären Carcinoms (HCC) in 3-10% der Fälle<sup>29,33,34</sup>. Zumeist wird die ALD in die 3 Stadien unterteilt: Steatosis hepatis, Steatohepatitis und Leberfibrose/Leberzirrhose, welche sich histologisch unterscheiden lassen; die Stadien werden dabei nicht streng nacheinander durchlaufen, sondern können in der Leber eines Individuums parallel vorliegen und nachgewiesen werden<sup>30</sup>.

Die Diagnosestellung eines alkoholbedingten Leberschadens beruht auf der positiven Anamnese in Bezug auf Alkoholkonsum, wobei der von den Patient\*innen zugegebene Konsum meist deutlich geringer als der tatsächliche Konsum ist, oder aber der Konsum sogar komplett verneint wird<sup>35,36</sup>. Des Weiteren werden hierbei histologische Veränderungen und die Erhöhung von laborchemischen Parametern, die im peripheren Blut nachgewiesen werden können, berücksichtigt<sup>37</sup>. Für die Evaluation des riskanten Alkoholkonsums wurden multiple Scores und Tests entwickelt, häufig angewendet wird z.B. der CAGE-Test (*C- cut down, A- annoying, G- guilty, E- eye opener*). Als laborchemische Parameter können Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), das mittlere corpuskuläre Volumen (MCV) und das Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT)<sup>38</sup> Hinweise auf das Vorliegen einer ALD geben. In fortgeschrittenen Stadien kommen Bilirubinerhöhung, Hypoalbuminämie, Thrombozytopenie und eine veränderte

## **Einleitung**

---

Partielle Thromboplastinzeit (PPT) hinzu. Offensichtlicher als die klinische Diagnose einer ethanolbedingten Lebererkrankung ist in den meisten Fällen die Diagnose des chronischen Alkoholismus, gekennzeichnet durch typisches psychovegetatives Verhalten und äußerliche Merkmale. In der klinischen Untersuchung fällt als körperliches Symptom der Leberverfettung eine Lebervergrößerung, Hepatomegalie, auf. Abdominelle Beschwerden, Völlegefühl, Oberbauchschmerzen, oder Übelkeit können wechselnd intermittierend auftreten, sind aber nicht obligat<sup>39</sup>. 20-30% der Patient\*innen zeigen im Stadium der Fettleber Hautveränderungen wie Spider naevi oder Palmarerythem<sup>40</sup>. Im Stadium der Steatohepatitis, einer Fibrose oder der Zirrhose, sind die klinischen Symptome sehr unterschiedlich ausgeprägt, und die Patient\*innen können nahezu asymptomatisch bis zu schwer erkrankt imponieren. Folgende mehr oder minder unspezifische klinische Beschwerden und Befunde können hierbei auftreten: Fieber, Gewichtsverlust, Übelkeit, Erbrechen, Meteorismus, abdominelle Schmerzen, Hepatomegalie, Splenomegalie, Ikterus, hepatische Enzephalopathie, Spider naevi, Palmarerythem, Gynäkomastie bei Männern, Ödeme, Aszites. Liegt eine fortgeschrittene Fibrose oder Zirrhose vor, so treten zusätzlich die leberspezifischeren Zeichen und Folgen der Leberinsuffizienz und des Pfortaderhochdrucks in den Vordergrund, mit Ikterus, Ödemen, Aszites, Splenomegalie und Ösophagusvarizen.

Die Sonographie ist die bildgebende Methode der ersten Wahl, wenn Klinik und Laborbefunde den Verdacht auf eine alkoholische Lebererkrankung lenken. Hier imponiert bei Vorliegen einer Fettleber eine erhöhte Echogenität des Leberparenchyms. Der Übergang von der Fettleber zur Fibrose, Steatohepatitis oder frühen Zirrhose, kann mittels Sonographie aber nicht bestimmt werden. Bei voller Ausprägung der Zirrhose wiederum können Veränderungen des portalen Gefäßsystems als Ausdruck portaler Hypertension und Strukturveränderungen, wie einer welligen oder polyzyklischen Leberkontur bei abgerundetem oder verplumptem Leberrand dargestellt werden<sup>41</sup>. Des Weiteren bieten sonographische Verfahren auch die Möglichkeit der Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms, weshalb bei Vorliegen einer Zirrhose alle 6 Monate sonographische Kontrolluntersuchungen zur Früherkennung hepatozellulärer Karzinome empfohlen werden<sup>42</sup>. Zur Untersuchung des Vorliegens einer Leberfibrose/Zirrhose kann die Elastographie, eine nicht invasive Messung der Lebersteifigkeit, eingesetzt

## Einleitung

---

werden<sup>43,44</sup>. Diese ist bislang noch mit einigen Nachteilen behaftet, wie der unzureichenden Erfassung von gering oder mäßiggradig ausgeprägten Fibrosen, Störungsanfälligkeiten durch andere Leberveränderungen oder extrahepatische Faktoren wie Adipositas. Als Goldstandard der Diagnose einer Fettleber gilt die Leberbiopsie und nachfolgende histologische Untersuchung. Klinische und bildgebende Verfahren können zwar Hinweise auf das Vorliegen einer Fettleber geben, aber nicht das Ausmaß der Verfettung oder viele andere mögliche Erkrankungen der Leber bestimmen.

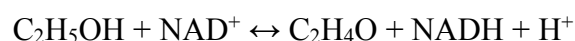
Zur Entnahme und Bearbeitung des Biopsiezylinders liegen Standardempfehlungen zur Leberbiopsie vor. In der Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) zur „Histopathologischen Diagnose der nicht alkoholischen und alkoholischen Fettlebererkrankung“ (deren Gültigkeit zum aktuellen Zeitpunkt zwar als „abgelaufen“ gilt, sich aber in der Überprüfung befindet)<sup>45</sup>, wird beschrieben, dass sich eine alkoholische Fettleber durch eine variable Einlagerung von Triglyceriden und weiteren Lipiden auszeichnet. Man spricht von einer Leberverfettung, wenn mehr als 5% und von einer „Fettleber“, wenn mehr als 50% der Hepatozyten beteiligt sind. Die Leberzellverfettung wird als Steatose bezeichnet, sie kann in einer mikrovesikulären (kleintropfigen), makrovesikulären (großtropfigen) oder gemischten Form vorliegen. Eine reine Fettleber wird nochmals in eine milde (Grad 1: Fetteinlagerung in  $< 1/3$  der Hepatozyten), mäßige (Grad 2: Fetteinlagerung in  $< 2/3$  der Hepatozyten) und schwere (Grad 3:  $> 2/3$  der Hepatozyten) eingeteilt. Die alkoholische Steatohepatitis zeichnet sich histologisch durch wabige Leberzellenstruktur, intrazelluläre Hyalinablagerungen (Mallory-bodies) Granulozytäre Infiltrate, aufgequollene und nekrotische Hepatozyten, „Maschendrahtfibrose“ und entzündlich infiltrierte Portalfelder aus<sup>46</sup>. Morphologisch können bei der alkoholischen Fettlebererkrankung die Stadien der Steatose, Steatohepatitis, Fibrose, Zirrhose und bis zum hepatozellulären Karzinom parallel vorliegen, wobei die reine Steatose ohne Vorliegen einer Zirrhose/Fibrose prinzipiell reversibel ist, ohne relevantes Progressionsrisiko. Demgegenüber hat die Steatohepatitis ein signifikantes Progressionsrisiko hin zur Entwicklung einer Fibrose und Zirrhose.

Bei der Therapie alkoholbedingter Lebererkrankungen müssen verschiedenste Aspekte von der psychologischen Betreuung über Ernährungsanpassung, medikamentöse Therapie bis zur Behandlung von Folgeerkrankungen (Pfortaderhochdruck, Ösophagusvarizen) berücksichtigt werden. Die Abstinenz ist oberstes Ziel der Therapie, darunter ist eine alkoholische Fettleber in der Regel innerhalb von Monaten vollständig reversibel<sup>40</sup>. Weitere Therapiemaßnahmen umfassen, je nach Stadium der Lebererkrankungen, eine Anpassung der Ernährung, einen Ausgleich von Nahrungsdefiziten, die Pharmakotherapie (exemplarisch genannt Glukokortikoide, anabole Steroide, Pentoxifyllin, Infliximab, Etanercept, Lecithin) bis hin zur Lebertransplantation<sup>47</sup> sowie Therapie von Folgeerkrankungen.

### 1.4 Alkoholstoffwechsel und Pathogenese des ethyltoxischen Leberschadens

Nach oraler Alkoholaufnahme wird Ethanol über fast die gesamte Länge des Gastrointestinaltraktes, vor allem im Dünndarm und Duodenum absorbiert und gelangt ins Blut. Ein geringer Teil des Alkoholes wird über die Lunge (1-5%), Urin, Schweiß und Speichel ausgeschieden, der weitaus größere Teil wird primär in der Leber, jedoch auch lokal im gastrointestinalen Gewebe durch diverse Enzymsysteme aus dem Blut eliminiert<sup>48</sup>.

Die Leber besitzt drei Systeme über die der Alkohol verstoffwechselt und abgebaut wird: die zytosolisch lokalisierte Alkoholdehydrogenase, das im endoplasmatischen Retikulum vorliegende Mikrosomale ethanoxidierende System (MEOS), und die in den Peroxisomen vorliegende Katalase<sup>49</sup>. Dabei ist die Alkoholdehydrogenase der Hauptstoffwechselweg. Im Abbauprozess wird Ethanol durch die humane Alkoholdehydrogenase 1 unter Beteiligung von NAD<sup>+</sup> zu Acetaldehyd oxidiert.



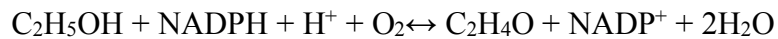
Das hierbei zytosolisch anfallende, energiereiche NADH Molekül führt zu einer Erhöhung des NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnisses wodurch die Glycerinphosphatkonzentration steigt, was die Akkumulation hepatischer

## Einleitung

---

Triglyzeride fördert, und wodurch Laktat aus Pyruvat und Malat aus Oxalacetat entsteht, das dann wiederum in die Energiegewinnung fließt. Außerdem akkumulieren zusätzlich Fettsäuren unterschiedlichen Ursprungs aufgrund diverser Stoffwechselstörungen und einer Reduktion der Fettsäureoxidation.

Liegen höhere Blutalkoholkonzentrationen vor, wandelt das mikrosomale ethanoxidierende System (MEOS) ebenfalls Ethanol in Acetaldehyd um.



Durch chronischen Alkoholabusus wird das Cytochrom P450-abhängige Isoenzym IIE1 im mikrosomalen ethanoxidierenden System (MEOS) induziert, und steigert damit die Beteiligung des MEOS am Ethanolabbau.

Der dritte enzymatische Weg des Alkoholabbaus, die Katalase in den Peroxisomen, kann unter Umständen Ethanol mithilfe von Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umwandeln. Dieser Oxidationsweg erscheint unter physiologischen Bedingungen jedoch keine größere Rolle zu spielen<sup>48</sup>.

Das Abbauprodukt des ersten Abbauschritts des Alkohols, Acetaldehyd, ist *per se* lebertoxisch. Es verursacht DNA-Schäden, und führt zu Lipid- und Protein-Oxidation<sup>50</sup>. Erhöhte Acetaldehyd-Konzentrationen führen klinisch zu Gesichtsrötung, Kopfschmerzen, Erbrechen, auch umgangssprachlich als „Kater“ bezeichnet, aber auch zu kardialen Arrhythmien. Acetaldehyd wird vornehmlich durch die Acetaldehyddehydrogenase 2 (ALDH2), welche einen sehr kleinen  $K_m$ -Wert für Acetaldehyd besitzt, in Acetat (Essigsäure) umgewandelt. Acetaldehyd bildet in der Leber Proteinaddukte, welche die Kupffer'schen Sternzellen aktivieren, die wiederum die Itozellen so modulieren, dass diese vermehrt Kollagen ausbilden, was die Ausbildung einer Leberzirrhose begünstigt<sup>51,52</sup>. Des Weiteren führt Acetaldehyd zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen. Zuletzt kann Acetat durch eine Aktivierung mit Coenzym A durch die Acetat-CoA Ligase in Acetyl-CoA umgewandelt und letztendlich zur Energiegewinnung durch den Citratstoffwechsel oder für die Biosynthesen, u.a. für Fettsäuren, verstoffwechselt werden.

Die Ansammlung von Fett in der Leber, und die damit einhergehende Steatose, entsteht vor allem durch folgende vier Prozesse: verminderte Synthese oder Sekretion von Lipoproteinen (*very low density lipoproteinen* VLDL) – dem

## Einleitung

---

Hauptweg hepatische Lipidelimination, verminderter  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien, eine vermehrte Aufnahme freier Fettsäuren aus der Nahrung oder aus dem Körperfett über die Pfortader, und vermehrter Synthese freier Fettsäuren aus Glukose über Acetat in der Leber. Nicht nur chronischer Alkoholkonsum, auch eine akute Alkoholintoxikation, z.B. im Rahmen eines „*binge drinkings*“, kann eine Akkumulation von Fett verursachen<sup>53</sup>. Kommen zusätzlich auch gemischt-zellige entzündliche Infiltrate in den Leberläppchen und eine Ballonierung der Leberzellen als Zeichen der Leberschädigung vor, spricht man von einer Steatohepatitis<sup>45</sup>. Als Erklärung dafür, wieso aus einer „harmlosen“, prinzipiell reversiblen Steatose eine Steatohepatitis entstehen kann, gibt es die sog. „*two hit*“-Hypothese<sup>54-56</sup>. Den ersten „Hit“ stellt dabei die Anhäufung von Fett und verstärkte Entwicklung von oxidativem Stress dar, wodurch die Hepatozyten sich entweder durch Hochregulierung von antioxidativen/antiapoptotischen Abläufen anpassen oder apoptotisch werden. Der zweite „*hit*“ ist der alkoholbedingte Verlust von Adenosintriphosphat (ATP), der die Hepatozyten in den nekrotischen Zelluntergang führt, und damit die Inflammation „triggert“<sup>54,57</sup>. Durch Zytochrom P<sub>450</sub> 2E<sub>1</sub>, ein Enzym des MEOS, wird neben Acetaldehyd auch 1-Hydroxyethyl-Radikal und reaktive Sauerstoffspezies; z.B. Wasserstoffperoxid(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hydroxy-Radikal (HO·) und Superoxid-anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) gebildet. Diese reaktiven Sauerstoffspezies können nur unzureichend abgebaut werden, und lösen relevante weitere Schäden aus. Auch die bei alkoholischer Lebererkrankung durch aus dem Darm stammenden Endotoxine aktivierten, hepatischen Kupffer-Zellen<sup>58</sup> produzieren zusätzlich pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine, v.a. IL-6, TNF $\alpha$ , welche den nekrotischen und apoptotischen Zelltod fördern, und so die Steatohepatitis fördern<sup>59</sup>.

Die anhaltenden Entzündungsprozesse, die bei der Steatohepatitis stattfinden, sind ein maßgeblicher Faktor für die Leberfibroseentwicklung, eigentlich ein Reparatur- bzw. Wundheilungsmechanismus, welcher bei Progredienz in der nicht reversiblen Zirrhose endet. Aktivierte hepatische Sternzellen (HSC's), die Itozellen, perisinusoidale Fettspeicherzellen oder hepatische Lipozyten synthetisieren vermehrt aus extrazellulären Matrixproteinen bestehendes Bindegewebe, welches die Fibrose verursacht. Die Aktivierung der eigentlich ruhenden, Vitamin A-speichernden HSC's im Disse'schen Raum erfolgt z.B. durch parakrine Stimulation von aktivierten Kupffer-Zellen in den Sinusoiden und durch reaktive

Sauerstoffspezies (ROS)-induzierten Zelltod von Hepatozyten. Sie wandeln sich hierdurch in myofibroblastenartige Zellen um, die übermäßig extrazelluläre Matrix, wie fibrilläres Kollagen, herstellen. Die Fibrosierung beginnt zunächst perivenulär, breitet sich dann weiter zwischen Portalfeldern oder Portalfeldern und Zentralvenen, sog. Brückenfibrose, und schließlich zur mikronodulären Zirrhose aus<sup>53</sup>.

Die Leber ist nicht das einzige Organ, das durch chronischen Ethanolabusus beeinflusst wird. Alkohol führt zu Schäden der Schleimhäute in Mundhöhle und Ösophagus, kann Refluxösophagitis auslösen, und die Entstehung bösartiger Tumore fördern. Auch im nachfolgenden Magen-Darmtrakt, Magen, Dünn- und Dickdarm sowie Pankreas können pathologische Prozesse ausgelöst werden<sup>60</sup>. In der Studie von Parlesak *et al.* wird aufgezeigt, dass Alkoholabusus zu einer vermehrten Permeabilität der intestinalen Barriere für Makromoleküle führt, was damit auch eine Translokation von Endotoxinen und bakteriellen Toxinen erlaubt<sup>61</sup>.

## 1.5 Hämorrhagischer Schock

Der Schock bezeichnet ein akutes generalisiertes Kreislaufversagen. Der hämorrhagische Schock ist charakterisiert als eine Form des Kreislaufversagens, die über den Verlust von Sauerstoffträgern (Erythrozyten), und gleichzeitigem Verlust von Blutvolumen, zu einer beeinträchtigten Makro- und Mikrozirkulation sowie Unterversorgung lebenswichtiger Organe mit Sauerstoff (Hypoxie) führt<sup>62</sup>. Er ist eine Unterform des hypovolämen Schocks, bei dem es durch ein vermindertes intravasales Blutvolumen zu einem Abfall des Blutdruckes und verminderter kardialer Vorlast und damit letztendlich zu einem Herz-Kreislaufversagen kommen kann. Je nach Ursache unterteilt man den hämorrhagischen Schock in den durch Blutverlust ohne relevante Gewebeschädigung verursachten „hämorrhagischen Schock“, und den durch Blutverlust und gleichzeitige ausgedehnte Gewebeschädigung mit Freisetzung von Mediatoren bedingten „traumatisch-hämorrhagischen Schock“<sup>63,64</sup>.

Patient\*innen, welche einen hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion durchlitten haben, reagieren darauf regelhaft mit einem sog. „systemic



inflammatory response syndrome“ (SIRS), das trotz aller intensivmedizinischen Therapiemaßnahmen nicht selten in einer irreversiblen Schädigung lebenswichtiger Organe, also einem MOV („multiple organ dysfunction syndrome“, MODS) gipfelt<sup>65</sup>.

### 1.6 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks und des Hämorrhagie/ Reperfusionstraumas

Durch den Verlust des Blutvolumens, und damit der Erythrozyten als Sauerstoffträger, kommt es zur Störungen der Makrozirkulation sowie der Mikrozirkulation, die wiederum zu einer Mangel durchblutung der Organe und dadurch zu einer ischämischen Hypoxidose mit beeinträchtigtem Zellstoffwechsel und Anhäufung toxischer Metabolite führen<sup>64</sup>. Die Störung der Makrozirkulation löst eine disproportionale Verteilung des Herzzeitvolumens mit verminderter Perfusion bestimmter Organe aus, und letztendlich auch in einer sekundären Mikrozirkulationsstörung mit Veränderung der Fließeigenschaften des Blutes und der Blutgerinnung. Hämodynamisch unterscheidet man nach peripherem Gefäßwiderstand und Verhalten des Herzzeitvolumens das hypodyname vom hyperdynamen Schocksyndrom. Das hypodyname Schocksyndrom ist gekennzeichnet durch ein erniedrigtes Herzzeitvolumen und einen Abfall des arteriellen Blutdrucks in der Anfangsphase, wodurch sympathoadrenerge Mechanismen als Gegenregulation aktiviert werden. Durch den verminderten arteriellen Druck werden die Barorezeptoren im Aortenbogen und Karotissinus stimuliert und der Sympathikotonus steigt. Es kommt zur Freisetzung von Adrenalin und etwas weniger Noradrenalin aus der Nebennierenrinde, was zu einer Stimulation von Betarezeptoren am Herzen mit Steigerung der Frequenz und Kontraktilität und damit erhöhtem Auswurf führt. Zudem werden über  $\alpha$ -Rezeptoren durch Konstriktion von Arteriolen die Durchblutung des Splanchnikusgebietes, der Nieren, Muskeln und Haut vermindert, Herz und Gehirn, die weniger  $\alpha$ -Rezeptoren aufweisen sind davon ausgeschlossen, wodurch sich die Umverteilung der Durchblutung auf diese überlebenswichtigen Organe oder sogenannte „Zentralisation“ im Schockgeschehen erklärt. Die Minderdurchblutung

## Einleitung

---

ist aber auch erster Schritt eines späteren Organversagens (Nierenversagen usw.)<sup>66</sup>. Zusätzlich bewirkt die Konstriktion von Venolen ein vermindertes venöses *pooling* und damit den verbesserten Blutrückfluss zum Herzen. Durch die Minderperfusion der Nieren kommt es zur Aktivierung von Renin und hierdurch zu einer Angiotensin-vermittelten Vasokonstriktion und erhöhten Sekretion von antidiuretischem Hormon. Dadurch wird die Natrium- und Wasserretention gefördert. Auf diese Weise können Volumenverluste bis zu 20 Prozent des Blutvolumens ausgeglichen und ein „kompensierter Schock“ erreicht werden. Bei weiter progredientem Volumenverlust können die Kompensationsmechanismen auch keine ausreichende Durchblutung mehr garantieren und es kommt zum „dekompensierten Schock“.

Das hyperdynamische Schocksyndrom, das vorwiegend bei der septischen Schockform vorliegt, gipfelt bei Persistenz ebenfalls im hypodynamen Schocksyndrom. Hierbei kommt es zur Endotoxin-vermittelten Freisetzung von Serotonin, Histamin und Tumornekrosefaktor und zur Aktivierung des Kalikrein-Kinin-, Komplement- und Gerinnungssystems. Diese Faktoren führen zu einem herabgesetzten Tonus präkapillarer Gefäß-Sphinkteren und vermehrter Durchblutung von arterio-venösen Shuntgefäßen, quasi einer Eröffnung der Peripherie.

Die Mikrozirkulationsstörung spielt sich im Bereich des kapillären Stromgebietes (terminale Arteriolen, Kapillaren und Venolen, Gefäßdurchmesser  $>300\mu\text{m}$ )<sup>67</sup>, in dem die Sauerstoff und Nährstoffabgabe ans Gewebe erfolgt, ab. Die Mikrozirkulation wird dabei durch den Tonus der prä- und postkapillären Widerstandsgefäße, den Perfusionsdruckgradienten (Ein- und Ausstromdruck) und natürlich die Fließeigenschaften des Blutes beeinträchtigt. Im Schock bewirken die endogenen Katecholamine eine verminderte Kapillardurchblutung mit daraus resultierender Gewebehypoxie. Die Gewebehypoxie aktiviert die anaerobe Glykolyse durch welche ATP gewonnen werden kann. Das bei der anaeroben Glykolyse entstehende Laktat führt zu einer Laktatazidose<sup>68</sup>. Die Mikrozirkulationsstörung löst ein stört das Verhältnis von nutritiver Durchblutung und kapillärer Austauschfläche jedoch auch die Gewebedrainage wird empfindlich gestört so dass es zu einer Ansammlung vorwiegend saurer Stoffwechselprodukte im Gewebe kommt was zu einer *hidden acidosis* führt<sup>67</sup>.

Aufgrund der Sauerstoffunterversorgung werden proinflammatorische Zytokine und Mediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1, Interleukin (IL)-6 usw. freigesetzt, die Gewebeendothelien schädigen und zum sogenannte „kapillären Leck“ führen. Durch dieses kapilläre Leck kommt es zu einer Flüssigkeitsverschiebung aus dem Intra- in den Extravasalraum und zur Ödembildung, was die Sauerstoffversorgung nochmals erschwert<sup>64,68-70</sup>.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoff-Spezies, die entstehenden Endothel-Dysfunktionen und Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel sowie deren verstärkte Infiltration in die Organe spielen nachfolgend eine tragende Rolle in der Entwicklung der Inflammationsreaktion, die nach Hämorrhagie Reperfusionstrauma auftritt<sup>67,71</sup>. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen nach H/R im geschädigten Gewebe sowie in aktivierten polymorphonukleären Leukozyten (PMNL). Eine Quelle der reaktiven Sauerstoff- und der Stickstoffspezies sind unter anderen extramitochondrial die NAD(P)H-Oxidase, Cytochrom P450, Xanthin-Oxidase, Nitritoxid Synthase und dem mitochondrialen Metabolismus, *via* Komplex I und III<sup>72-74</sup>. Die NAD(P)H-Oxidase ist ein Enzymkomplex, der die Bildung von Superoxid durch die Reduzierung von Sauerstoff katalysiert, wobei NAD(P)H als Elektronen-Donor fungiert. Die NAD(P)-Oxidase-komponenten liegen bis zur ihrer rezeptorvermittelten Aktivierung membrangebunden und zytosolisch vor, und werden durch Stimulation zu einem aktiven Oxidase-komplex. ROS führen zur Zytokinproduktion<sup>65,72,75</sup>. Freie Radikale bewirken Schäden an den Doppellipid-Membranen von Zellen, Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum *via* Lipid-Peroxidation, was zu einer Störung der Zell und Zellorganellfunktionen führt<sup>71</sup>. Eine weitere Quelle reaktiver Sauerstoff-spezies ist das Enzym Xanthin-Oxidase<sup>72</sup>. Die Xanthin oxidase ist evolutionär gesehen ein altes Enzym das von den Prokaryonten bis zu Säugertieren vorkommt und vielen Geweben und Organen vorhanden ist. Unter physiologischen Bedingungen baut im Rahmen des Purinstoffwechsels die Xanthindehydrogenase Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure ab. Dazu verwendet die Xanthindehydrogenase Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Liegt nun eine anaerobe Stoffwechselsituation vor, wie bei Ischämie-Reperfusionssyndrom, kommt es aufgrund des Sauerstoffmangels und Aufbrauchen des ATP vorerst zu einer Ansammlung von Hypoxanthin, dem Zwischen-abbauprodukt der Purinbasen Guanin und Adenosin. In dieser Situation kann die Xanthindehydrogenase zu der Enzymvariante

## Einleitung

---

Xanthinoxidase umgewandelt werden, dem Coenzym NAD als Elektronen-Akzeptor dient. Dies geschieht aufgrund des Ausfalls der Kalziumpumpe und dem daraus resultierenden Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter Sauerstoffmangel. Steht Sauerstoff durch die Reperfusion wieder zur Verfügung, kann die Xanthinoxidase nun Hypoxanthin unter der Verwendung von Sauerstoff als Elektronenakzeptor anstatt von  $\text{NAD}^+$  verwenden. Dabei entstehen Superoxidanionen, die nachfolgend durch Katalase und Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umgewandelt werden<sup>76-78</sup>. Durch Allopurinol, einen kompetitiven, reversiblen Inhibitor der Xanthinoxidase kann die Freisetzung freier Radikale bei Ischämie-Reperfusionstrauma vermindert werden<sup>77,79</sup>. In der Studie von Byung-Rok wurde gezeigt, dass die Hemmung der Xanthin-Oxidase durch Allopurinol im Ischämie-Reperfusionsmodell den mitochondrialen Schaden und damit oxidativem Stress und Lipidperoxidation vorbeugen und somit hepatoprotektiv wirken kann<sup>71</sup>. Auch durch eine Fenton Reaktion, also die durch Eisensalze katalysierte Oxidation organischer mit Wasserstoffperoxid werden hochtoxische Hydroxylradikale gebildet<sup>73,80</sup>. Außer der direkt toxischen Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf Zellen aktivieren sie neutrophile Granulozyten und die Bildung von Adhäsionsmolekülen (wie ICAM-1, VCAM-1) was zu einer weiteren Ansammlung von Leukozyten und damit Steigerung der Inflammation führt.

Diese Inflammationsreaktion im Rahmen des H/R-Geschehens ist assoziiert mit einer Freisetzung von verschiedenen Entzündungs-Mediatoren, die unter anderem das Komplementsystem, die Gerinnungskaskade und den Arachnoidonsäure-Stoffwechsel aktivieren<sup>81,82</sup>. Unter anderem werden verschiedene Zytokine wie zuvor genannten  $\text{TNF}\alpha$  und die Interleukine IL-1, IL-6, und IL-8 freigesetzt<sup>81-89</sup>. Die Endothelzellen wiederum exprimieren endotheliale Adhäsionsrezeptoren, die die Leukozyten-Endothelinteraktion begünstigen und zusätzlich die Mikrozirkulation beeinträchtigen<sup>90</sup>. Durch die reperfusionsbedingte Erhöhung der kapillären Permeabilität wird die zelluläre Integrität beeinträchtigt<sup>91,92</sup>. Hierbei wandern verstärkt die adhärenenten Leukozyten in das umliegende Gewebe und bilden lokal entzündliche Infiltrate, die zu Organschädigungen oder sogar zum kompletten Organversagen nach H/R führen können<sup>93-95</sup>. Die zuvor beschriebenen ROS schädigen intrazelluläre Proteine und die Desoxyribonukleinsäure (DNS) von benachbarten Zellen<sup>85,96,97</sup>. Es entsteht ein

*circulus vitiosus* der die inflammatorischen Vorgänge vorantreibt<sup>98-101</sup>. Die Fehlfunktion eines so wichtigen Organs wie der Leber nach Hämorrhagie und Reperfusion wird zu einem großen Teil durch die ROS und Inflammationsprozesse bedingt<sup>102</sup>.

Die freigesetzten Mediatoren lösen ebenso wie ROS über Zellrezeptoren vor allem auch in Hepatozyten verschiedene Signalkaskaden aus. Beispielsweise kommt es über den sog. MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)- Signalkaskade zur Induktion der Transkriptionsfaktoren c-Jun/AP-1 (Aktivatorprotein-1)<sup>103</sup> und NF- $\kappa$ B (*nuclear faktor- $\kappa$ B*)<sup>104</sup>. AP-1 und NF- $\kappa$ B tragen schlussendlich über die Bindung an ihre Zielgene zur Bildung von weiteren Zytokinen und Akut-Phaseproteinen bei und unterhalten so die posttraumatische systemische Inflammation<sup>105,106</sup>.

### 1.7 Auswirkungen der Hämorrhagie/Reperfusion auf die Leber

Die Leber ist ein Organ deren Hepatozyten einen hohen metabolischen Umsatz haben, weshalb sie auch empfindlich auf die schädlichen Einflüsse von Hypoxie reagieren<sup>71</sup>. Hinzu kommt der Faktor, dass es im Hämorrhagie-Reperfusionsgeschehen durch die ebenfalls Schock-bedingte Schwächung der intestinalen Barriere zu vermehrten Anfall von Bakterien und Toxinen aus dem Magendarmtrakt, beispielsweise LPS (Lipopolysaccharide) und auch von körpereigenen Zellstoffwechsel- und Zellabbauprodukten kommt, die über den Blutstrom *via* der Portalvene in die Leber transportiert werden<sup>67,107,108</sup>. In den Lebersinusoiden werden nun die Kupffer-Zellen, die die größte Population Gewebe fixierter Makrophagen im Körper ausmachen<sup>109</sup>, durch diese Pathogene aktiviert, und bilden IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1)<sup>78,110-114</sup>. Durch die vermehrte Zytokinproduktion, Depression der Lymphozytenfunktion, die verminderte Fähigkeit zur Phagozytose und Antigenpräsentation, wird die Ausbildung von SIRS und MODS begünstigt. TNF $\alpha$  fällt dabei wohl eine bedeutende Funktion zu. Studien belegen die erhöhte TNF $\alpha$  Konzentration nach Hämorrhagie/Reperfusion<sup>115</sup>, und der experimentelle Einsatz

von TNF- $\alpha$  Antikörpern führte zu höheren Überlebensraten nach Hämorrhagischem Schock<sup>112,116</sup>. Hildebrand/Chaudry bestätigten die Verminderung proinflammatorischer Zytokinbildung infolge einer „Depletion“ der Kupffer-Zellen durch Gadoliniumchlorid-Gabe<sup>110</sup>.

In der Leber sind die Kupffer-Zellen und Neutrophile die Hauptproduzenten von Sauerstoffradikalen<sup>73,117</sup>. Sauerstoffradikale und die durch sie ausgelösten Signalwege haben nebenbei nicht nur zellschädigende Eigenschaften, sie vermitteln auch zellprotektive Mechanismen. Jedoch sind die Sauerstoffradikale auch die wesentlichen Auslöser von Apoptose und Onkose. Onkose bezeichnet einen ischämisch bedingten Zelltod mit Mitochondriendestruktion, Zellödem bei initial intaktem Zellkern und wird oftmals synonym mit dem Begriff der Nekrose verwendet<sup>118</sup>. Es kommt dabei zum Verlust der Membranintegrität, Zellschwellung und letztendlich „Zerplatzen“ die Zellen. Durch die nachfolgende Freisetzung des gesamten Zellinhaltes in die Umgebung, kommt es zur Schädigung des umgebenden Gewebes<sup>119</sup>. Die Apoptose beschreibt im Gegensatz dazu den Mechanismus des „programmierten Zelltodes“, der sich durch Zellschrumpfung, Kondensation und Degradierung der DNA und Fragmentierung der Zelle ohne eine begleitende Inflammationsreaktion des umliegenden Gewebes auszeichnet.

Bei Beginn der Ischämie kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativem Stress in den Hepatozyten<sup>120</sup>, wodurch unter anderem *high mobility group box 1* (HMGB1) freigesetzt wird<sup>121-124</sup>. HMGB1 aktivieren über TLR-4 Rezeptoren die Kupffer-Zellen<sup>125</sup>, die wiederum die wichtigsten Produzenten von reaktiven Sauerstoffspezies in der Frühphase des Ischämie- Reperfusionsgeschehens darstellen<sup>126</sup>.

### 1.8 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*) ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor mit elementarer Bedeutung in der Immunkaskade bei Inflammationsgeschehen, der Zellproliferation und der Apoptose<sup>127</sup>. Er wird unter anderem durch Zytokine, wie z.B. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , bakterielle Zellwandbestandteile, apoptotische oder nekrotische Stimuli wie ultraviolettes Licht sowie freie Radikale aktiviert. Unter NF- $\kappa$ B fasst man Rel A (p65), Rel B, c-Rel und die Precursor Proteine NF- $\kappa$ B 1 (p105) und NF- $\kappa$ B 2 (p100), die durch Proteolyse in p50 und p52 umgewandelt werden, zusammen. Alle NF- $\kappa$ B Proteine besitzen eine Rel-Homologie-Domäne (ca. 300 Aminosäuren), die für die DNA-Bindung und Dimerisation zuständig ist. Innerhalb dieser NF- $\kappa$ B Proteinfamilie bilden sich Homo- oder Heterodimere zwischen gleichen oder verschiedenen Proteinen aus, Heterodimere bilden sich dabei bevorzugt zwischen p50 oder p52 und einem der Rel-Proteine aus<sup>128-130</sup>.

Die Aktivität von NF- $\kappa$ B wird posttranskriptionell durch die Interaktion mit den inhibitorischen I $\kappa$ B-Proteinen reguliert. NF- $\kappa$ B liegt in den meisten Zellen im Cytoplasma als latent inaktive Form in einem mit seinem Inhibitor I $\kappa$ B verbundenen Komplex vor. Unter den I $\kappa$ B werden mehrere Proteine z.B. I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  und *Drosophila cactus* zusammengefasst, die unterschiedliche Affinität zu den unterschiedlichen NF- $\kappa$ B Dimeren aufweisen<sup>54,131,132</sup>. Durch bestimmte Stimuli kommt es zur Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine durch den I $\kappa$ B-Kinasekomplex (IKK), und damit zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Der IKK-komplex besteht aus zwei katalytisch aktiven Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  und der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$  (NEMO). Es werden zwei Hauptwege beschreiben über die NF- $\kappa$ B aktiviert wird, der kanonische und der nicht-kanonische. Der kanonische Weg wird durch Stimuli wie Zytokin-rezeptoren wie z.B. Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor (TNFR) und Interleukin-1-Rezeptor (IL1-R), Antigen-Rezeptoren und weitere Rezeptoren wie den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) induziert<sup>133</sup>. In Abhängigkeit von IKK $\beta$  und NEMO wird I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert, und vor allem p65-enthaltende Heterodimere gelangen in den Kern, wo sie ihre transkriptionale Aktivität entfalten.

Der nicht kanonische Weg basiert auf einer auf IKK $\alpha$  beruhenden Phosphorylierung von p100 und RelB, und wird beispielsweise durch CD40-Liganden, BAFF und Lymphotoxin- $\beta$ , Mitglieder der TNF-Cytokinfamilie, induziert. Durch die Phosphorylierung kann der I $\kappa$ B-Komplex ubiquitinyliert werden, wodurch er dann in den Proteasomen abgebaut wird<sup>128,129</sup>.

Viele Signalwege wirken über NF- $\kappa$ B wie z.B. die TRAF-Familie (Tumour necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor), die wiederum den kanonischen und nicht kanonischen Weg hoch oder herunterregulieren können. Auch eine direkte Interaktion von NF- $\kappa$ B mit anderen Transkriptionsfaktoren ist möglich. NF- $\kappa$ B p56 kann direkt mit c-Jun und c-Fos interagieren und die Bindung von AP-1 an die DNA und die Aktivierung durch AP-1 stellen stimulieren. NF- $\kappa$ B fördert auch die Expression von Mitgliedern der AP-1 Familie wie JunB, JunD, B-AFT und c-Fos<sup>128,134-137</sup>.

Bei vielen Erkrankungen, die mit chronisch entzündlichen Reaktionen einhergehen wie rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Psoriasis, Multiple Sklerose, und das posttraumatische SIRS, findet sich eine erhöhte NF- $\kappa$ B Aktivierung<sup>54,138-141</sup>. Bei diesen Erkrankungen kommt es zu einer übermäßigen Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokine wie beispielsweise TNF $\alpha$ . Folglich könnte die Steuerung von NF- $\kappa$ B als antiinflammatorische Therapiestrategie genutzt werden, um Gewebeschäden bei übermäßiger inflammatorischen Antwort zu reduzieren<sup>142</sup>. Mehrere Studien belegen, dass eine Hemmung des NF- $\kappa$ B auch den umgekehrten Effekt haben kann, und dadurch aggravierte Inflammationsreaktionen ausgelöst werden können. So zeigen Mäuse mit einem IKK $\gamma$  (NEMO) Defizit in intestinalen epithelialen Zellen spontane schwere inflammatorische Zustände, was die zweiseitige Wirkung von NF- $\kappa$ B unterstreicht<sup>143</sup>. Auch chronischer Alkoholabusus sowie H/R sind mit einer signifikanten Erhöhung der NF- $\kappa$ B Aktivität assoziiert<sup>144</sup>.

Es gibt viele Bestrebungen Therapien durch die Hemmung von NF- $\kappa$ B zu entwickeln. Viele bereits in Anwendung anti-inflammatorischen Medikamente bewirken eine NF- $\kappa$ B Inhibition, wobei die genauen Zusammenhänge noch unklar sind. Als Beispiel für eine spezifische Hemmung ist die Anwendung eines I $\kappa$ B $\alpha$



„super repressor“ (SR) proteins oder von *small-molecule inhibitors* des IKK-komplexes die die Phosphorylierung des I $\kappa$ B-kinasekomplexes verhindern<sup>145-147</sup>.

### 1.9 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und Aktivator Protein-1 (AP-1)

C-Jun N-terminale Kinase (JNK), auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet, gehört zu der Familie der MAP-Kinasen. Zahlreiche zelluläre Prozesse wie der Zellzyklus, Zelldifferenzierung Zellproliferation, Zelltod, Embryogenese und Beeinflussung der Homöostase werden über die MAPK Kinasen reguliert<sup>148</sup>.

Neben den drei C-Jun N-terminalen Kinasen (JNK 1-3), gehören die extrazellulär signalregulierten Kinasen 1-5 (ERK 1 - 5), und die p38 Isoformen (p38 MAP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) zu den MAPK. Die MAPK-Kaskade setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Kinasen zusammen, wobei die Signaltransduktion an der Zellmembran beginnt, und im Zellkern ihr Ende findet. Die Stimuli, die zu der Aktivierung der MAP-Kinasen führen sind spezifisch. Die JNK-Isoformen werden beispielsweise durch alle verschiedene Arten von „Zellstress“, wie Druck oder Scherkräfte, Zytokine, UV-Licht, Hitze oder osmotische Einflüsse aktiviert. Durch einen membranständigen Rezeptor wird der Stimulus an eine MAPK-Kinase-Kinase (MPKKK oder MEKK) übertragen. Die MPKKK aktiviert durch Phosphorylierung die MAPK-Kinase (MAPKK oder MEK), welche wiederum über eine Phosphorylierung die MAPK (ERKs, JNKs, p38MAPs) aktivieren kann.<sup>148,149</sup>

Die C-Jun N-terminale Kinasen sind in der Lage Serine in der N-terminalen Transaktivierungs-Domäne (Position 63 und 73) des c-Jun-Proteins spezifisch zu phosphorylieren, und somit zu aktivieren<sup>150</sup>. c-Jun gehört zusammen mit JunB und JunD zur Jun-Familie, welche entweder homodimere, oder zusammen mit den Mitgliedern der fos- oder ATF-Familie, heterodimere Komplexe bilden können. Die Jun-, fos- und ATF-Familien sind dabei allesamt dem AP-1 (Aktivator-Protein 1) zuzuordnen<sup>151</sup>. Die anderen beiden Jun Proteine werden nicht wesentlich durch JNK aktiviert, JunB bindet zwar an JNK wird jedoch nicht dadurch phosphoryliert

und JunD hat nur eine sehr begrenzte Bindung an JNK. Aktivator-Protein 1 ein Überbegriff für die Dimere der Transkriptionsfaktoren Jun, Fos oder ATF(Activating transcription factor)- Untereinheiten, die an die gemeinsame AP-1-Bindungsstelle der DNA anbinden können<sup>152</sup>. Bindet AP-1 an seine entsprechenden Zielgene (Wachstumsfaktoren, verschiedene Metalloproteinasen, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, zelltypspezifische Genprodukte und Apoptoseregulatoren), greift es dadurch entscheidend in die Steuerung der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose ein<sup>153</sup>.

JNK wird als möglicher therapeutischer Angriffspunkt oder Möglichkeit zur Beeinflussung der Pathogenese verschiedener Krankheiten (zerebrale Ischämie, Diabetes II, Tumorgenese, Ischämie-Reperfusionstrauma) gesehen. Nateri *et al.* konnten in einem intestinalen Maus-Tumormodell zeigen, dass die Tumoranzahl vermindert und die Überlebenszeit durch eine Ablation des c-jun Gens oder Mutation der JNK-phosphorylisierungsdomäne von c-jun signifikant verlängert werden kann<sup>154</sup>. Eine *in vitro*-Studie an Hepatozyten-Zellkulturen von Marderstein *et al.* konnte zeigen, dass die Behandlung mit SP600125 (Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-1), einem JNK Inhibitor, der durch Bindung an die ATP-bindende Domäne kompetitiv und reversibel die JNK hemmt, einen antiapoptotischen Effekt bewirkt<sup>155</sup>. Auch die durch Hämorrhagie Reperfusionstrauma ausgelöste Inflammationsreaktion, wie es nach Polytraumata der Fall ist, kann durch eine Beeinflussung von JNK moduliert werden. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass es durch eine selektive JNK Hemmung zu einer verminderten IL-6-Produktion, reduziertem oxidativen Stress, verminderten Leukozyteninfiltration und damit höheren Überlebensraten kommt<sup>156,157</sup>. Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass eine systemische Applikation eines JNK-Inhibitors sowohl vor als auch nach H/R die systemische und lokale Leberinflammation und den H/R-induzierten Leberschaden reduzieren konnte<sup>156,158</sup>.

Die Arbeitsgruppe um Borsello *et al.* konnte die neuroprotektive Wirkung des JNK-Inhibitors D-JNKI-1 nach zerebraler Ischämie *in vivo* darstellen. Durch D-JNKI-1 konnte die Größe der zerebralen Läsionen sowie das funktionelle *outcome* signifikant verbessert werden<sup>159</sup>.

### 1.10 D-JNKI-1, ein spezifischer Peptid-Inhibitor der c-Jun N-terminalen Kinase

Um die Beeinflussung hepatischer Organschäden und der Inflammationsreaktion durch c-Jun / AP-1 unter chronischem Alkoholabusus zu untersuchen, setzten wir den JNK-Inhibitor D-JNKI-1 ein. Bei D-JNKI-1 handelt es sich um ein zellgängiges Peptid, das durch eine kompetitive Hemmung den Zugang von JNK zu seinem Target c-Jun und anderen Substraten blockiert<sup>159,160</sup>. Neben der in dieser Arbeit verwendeten *all-D-retroinverso* Form des Peptides (D-JNKI-1), die proteaseresistent ist, und über eine verlängerte Halbwertszeit *in vivo* verfügt, existiert auch eine L-Form (L-JNKI-1). Beide Formen sind hoch spezifisch für JNK und interagieren nicht mit anderen Kinasen. Die Inhibitorpeptide entstehen durch die Bindung der Human immunodeficiency virus type 1 transactivator of transcription - (= HIV Tat(48-57)) Transportersequenz an die JNK Bindungsdomäne des JNK-interacting protein 1/ islet brain (JIP-1/IB-1). Dies ermöglicht einen aktiven Transport des Peptids in die Zelle. JIP-1/IB-1 und c-Jun teilen sich das gleiche Bindungsmotiv an JNK, jedoch ist die Bindungsaffinität von JIP-1/IB-1 um ein Mehrfaches höher. Dadurch entsteht ein hoch spezifischer Inhibitor der JNK, der nicht mit der Aktivität anderer Kinasen interagiert<sup>159,160</sup>. Andere Inhibitoren wie zum Beispiel SP600125, ein Anthrapyrazolon-Inhibitor, binden bspw. kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle<sup>161</sup>. Es hat sich aber gezeigt, dass diese anderen Inhibitoren auch an p38 und NF- $\kappa$ B binden, was Bedenken über die Selektivität beziehungsweise Spezifität derselben aufwirft<sup>162</sup>.

### 1.11 Fragestellung

Kann D-JNKI-1 über die selektive Inhibierung der JNK den Leberschaden sowie das Inflammationsgeschehen bei einer chronisch ethanolvorgeschiedigter Leber nach Hämorrhagie/Reperfusionstrauma im Tiermodell der Maus verbessern?

### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Material

##### 2.1.1 Geräte und Materialien

**Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller; alphabetisch geordnet.**

<b>Geräte</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blutdruckmessgerät	BPA–Blood pressure Analyser 400	Digi-Med (Louisville, USA)
Analysator DT 60 und dem Zusatzmodul DTSC	Kodak Ektachem	Johnson & Johnson
ELISA-Reader	Infinite M2000	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
Elektrokauter	Sp Kauterset Typex Standard R14/B1	Servoprax GmbH (Wesel)
Färbeautomat	Midas e	Diagnostic Inc. Merck (Darmstadt)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z1	Carl Zeiss AG (Jena)
Gewebeeinbettautomat	Hypercenter XP	Shandon (Karlsruhe)
Heizkissen	HK50	Beurer GmbH (Ulm)
Hochleistungsscanner für Westernblot	Fusion-FX7	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Homogenisator	Precellys 24 lysis & homogenization	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Kühlplatte	Tissue Cool Plate COP 20	Medite Medizintechnik (Burgdorf)
Lichtmikroskop	OPMI 1-FR	Zeiss (Jena)
Magnetrührer	REC- G	Kika Labortechnik (Staufen)
MSI Minishaker	Vortex	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroskop	Mikroskop OPMI 1-FR	Carl Zeiss AG (Jena)
Narkosegerät	Trajan 808	Dräger AG (Lübeck)

## Material und Methoden

---

Narkoseverdampfer	Vapor Isofluran	Dräger AG (Lübeck)
Parafinausbett-Automat	EG 1120	Leica Mikrosystem (Wetzlar)
pH-Meter	Typ 632	Metrohm (Herisau, Schweiz)
Phasenkontrastmikroskop	Typ IMP-2	Olympus (Hamburg)
Photometer	Spectrophotometer UVIKON 933	Bio-Tek Kontron Instruments (Neufahrn)
Pipettierhilfe		Biohit (Helsinki, Finnland)
Protein-Minigel-Apparatur		Biorad (München)
Protein-Transfer-Apparatur		Biorad (München)
Realtime PCR-Gerät	Stratagene Mx3005P QPCR System	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Rotationsmikrotom, halbautomatisch	Leica RM2245	Leica Camera AG (Solms)
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph (Schwabach)
SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese- Kammer	Mini Protein II Apparatur	Biorad (München)
Taschenwaage	TEE 150-1	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Temperatursonde	Envitec K-25500	Krömker GmbH (Schwerte)
Tischleuchte		Micro Bio-Tec- Brand (Giessen)
Überwachungsmonitor	Sirecust 732	Siemens AG (München)
Waagen	Typ 2442 Typ 3706	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad		GFL (Burgwedel)
Zentrifuge	Biofuge fresco Megafuge 1.0R	Heracubus (Hanau)

**Tabelle 2: Verwendete Materialien und Hersteller; alphabetisch geordnet.**

Materialien	Hersteller
Alufolie	Toppits / Cofresco GmbH (Minden)
Arterienklemme gerade BH442R	Aesculap (Tuttlingen)
Augensalbe Bepanthen	Bayer GmbH (Leverkusen)
Blotting-Papier Typ GB002	Schleicher & Schüll (Dassel)
Chirurgische Schere (gerade) F.S.T.14517-17	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Chirurgische Schere (gebogen) F.S.T.14517-10	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Combistopper	B. Braun (Melsungen)
DC-Protein-Assay	Biorad (München)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Dewar Gefäß	KGW Isotherm (Karlsruhe)
Einbettkassetten	Sinowa (Leimen)
Einbettrahmen	Simport (Bernard Pilon, Kanada)
Einmalhandschuhe	Hartmann AG (Heidenheim)
Einmalpipetten, steril	Costar Corning (New York, USA)
Einmalskalpell (Klinge 15)	Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)
Eisstyroporbox	
Enthaarungscreme Balea	DM GmbH (Karlsruhe)
Eppendorfcubes	Eppendorf (Hamburg)
FACS-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one (Frickenhäuser)
Färbeküvetten	Vitlab GmbH (Großostheim)
Färbetrog	VWR International (Darmstadt)
Färbewanne	VWR International (Darmstadt)
Insulinspritzen 1ml	BD Plastipak (Heidelberg)
Kanülen 25G	B. Braun (Melsungen)
Kryoröhrchen CryoTubes	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
Leukoplast	BSN medical (Hamburg)
Leukosilk	BSN medical (Hamburg)
Microfuge Röhrchen	Beckman Coulter (Krefeld)
Mikrotomklingen S35	Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)
Mikro- Federschere FD100R	Aesculap (Tuttlingen)
Mikro-Nadelhalter FM522R	Aesculap (Tuttlingen)
Mikro-Pinzette gerade (anatomisch) FD280R	Aesculap (Tuttlingen)
Mikro-Pinzette gebogen (anatomisch) FD281R	Aesculap (Tuttlingen)
Multiply-Pro Gefäß 0,2mL („PCR cups“)	Sarstedt (Nürnberg)
Nahtmaterial Prolene® 4-0 / Vicryl® 3-0	Ethicon GmbH (Norderstedt)

## Material und Methoden

---

Objektträger	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
Präparierschere (gerade) BC162R	Aesculap (Tuttlingen)
Primerassays	SA-Biosciences (Frederick, MD, USA)
Polythylenkatheter	Smiths Medical GmbH (Grasbrunn)
Schöpfkelle	Bochem (Weilburg)
Schwammtücher	Biorad (München)
Spritzen 5 ml / 10 ml	B. Braun (Melsungen)
Standzylinder	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Terumo Spritze mit Nadel 25G x 5/8" (0,50 x 16mm)	Terumo (Eschborn)
Tissue-Tek O.C.T	Sakura (Japan)
Tissue Culture Plate 96-Well	Sarstedt (Nürnberg)
Wattestäbchen	Noba GmbH (Wetter)
Zentrifugen-Röhrchen	Sarstedt (Nürnberg)

## Material und Methoden

### 2.1.2 Chemikalien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Hersteller; alphabetisch geordnet.**

Chemikalien und Biochemikalien	Hersteller
Acrylamidlösung (30%)	Roth (Karlsruhe)
Ammonium Peroxo Disulfat (APDS)	Merck (Darmstadt)
Antibody Diluent	Dako (Hamburg)
Bisacrylamidlösung (2%)	Roth (Karlsruhe)
Chemolumineszenz-Lösung	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Color Marker Wide Range	Sigma (Taufkirchen)
DAB (Diaminobenzidine), DAB-Chromogen	Dako (Hamburg)
DeltaSelect aqua ad iniectabile (50ml)	B. Braun (Melsungen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Einschlussmittel <i>antifade embedding medium</i>	Oncor (Gaithersburg, USA)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Elektrophorese Marker ColourBurst™	Sigma (Taufkirchen)
ELISA kit Quantikine Mouse IL-6	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Eosin 0,5%	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (EtOH) 70%, 95%, 100%	Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Universität (Frankfurt a. M.)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma (Steinheim)
Eukitt® Einschlussmittel	O. Kindler GmbH (Freiburg)
Formaldehydlösung (10%)	Roth (Karlsruhe)
Fuoreszenz Mounting Medium	KPL (Gaithersburg, USA)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
Hämatoxylin- Lösung (HTX)	AppliChem (Darmstadt)
HCL (2 N)	Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Universität (Frankfurt a. M.)
HCL-Alkohol (Hydroxychlorid)	Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Universität (Frankfurt a. M.)
Heparin Natrium 25000 I. E.	Ratiopharm GmbH (Ulm)
Hypoxyprobe	Chemicon (Temecula, USA)
Isofluran Narkosegas	Abbott GmbH (Wiesbaden)
Isopropanol	Sigma (Taufkirchen)
Laemmli Sample Puffer	Biorad (München)
<i>Loading dye</i>	Promega (Mannheim)
Luminol	Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Universität (Frankfurt a. M.)
Milchpulver	Humana (Herford)
N,N -Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
Na-Azetat-Veronal-Puffer nach Michaelis	Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Universität (Frankfurt a. M.)



## Material und Methoden

---

Na-Deoxycholate	Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Universität (Frankfurt a. M.)
Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun AG (Melsungen)
Naphtol-AS-D Cholracetat	Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Universität (Frankfurt a. M.)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumnitrit 4%	Merck (Darmstadt)
Paraffin	Tyco Healthcare (Neustadt)
Pararosanilin (4%)	Merck (Darmstadt)
PBS (mit CaCL <sub>2</sub> und MgCL <sub>2</sub> )	Invitrogen / Gibco (Karlsruhe)
PBS (ohne CaCL <sub>2</sub> und MgCL <sub>2</sub> )	Invitrogen / Gibco (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM)	Sigma (Taufkirchen)
Pimonidazolhydrochlorid	Hypoxyprobe (Burlington, USA)
Reagenz A	Biorad (München)
Reagenz B	Biorad (München)
Ringer Injektionslösung 100ml	B. Braun AG (Melsungen)
Ringer-Lactat nach Hartmann (500ml)	B. Braun AG (Melsungen)
RT2 SYBR Green/Rox Master Mix	SABiosciences (Frederick, USA)
Stickstoff	Air Liquide (Düsseldorf)
<i>Target retrieval solution</i> pH 6 (Zitratpuffer)	Dako Cytomation (Hamburg)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure	Roth (Karlsruhe)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	AppliChem (Darmstadt)
Tritox X-100	Sigma (Karlsruhe)
Tween20	AppliChem (Darmstadt)
Xylol	J.T. Baker (Griesheim)
Xylocain 1%	AstraZeneca GmbH
Zinkformalin 10%	Anatomical Pathology International Clinical Diagnostics (Cheshire, UK)

## Material und Methoden

---

### 2.1.3 Antikörper, Kits und Testsubstanzen

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper, Kits, Substanzen und Bezugsquellen; alphabetisch geordnet.**

Antikörper/ Kit/ Substanz	Klon/ Bezeichnung	Bezugsquelle
D-JNKI-1		Arbeitsgruppe: T. Borsello (Mailand, Italien)
Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit	#M6000B	R&D Systems
Mouse IL-6 Flex Set	CatNo.558301 BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	BD Bioscience
Mouse TNF Flex Set	CatNo.558299 BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	BD Bioscience
Precision Plus Protein Standard	#161-0374	Bio Rad
Precision Protein Streptactin-HRP Conjugate	#161-0381	Bio Rad
Anti-β-Actin (mouse)	#A5441	Sigma (Karlsruhe)
Goat anti-rabbit IgG HRP	#AP132P	Merck Millipore (Darmstadt)
Goat Anti-Mouse IgG HRP	#12-349	Merck Millipore (Darmstadt)
c-Jun Rabbit mAb	#9165	Cell Signaling
Phospho-c-Jun Rabbit mAb	#2361	Cell Signaling
NF-κB p65 Rabbit mAb	#4764	Cell Signaling
Phospho-NF-κB p65 Rabbit mAb	#3033	Cell Signaling
Polymer anti-rabbit HRP		Dako (Hamburg)

## Material und Methoden

---

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Experimentelles Protokoll:

**Tabelle 5: Übersicht der Gruppenaufteilung.**

<b>Gruppe</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Gruppenbeschreibung</b>
<b>1</b> n = 8	<b><i>Ctrl sham</i></b> <b>NaCl</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Kontrolldiät-Fütterung</li><li>- sham-Operation: gleiche operative Intervention wie in Gruppe 5/6/7/8 aber kein H/R</li><li>- intraperitonealer <sup>4</sup> Injektion der Lösungsmittelkontrolle NaCl</li></ul>
<b>2</b> n = 4	<b><i>Ctrl sham</i></b> <b>D-JNK-1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Kontrolldiät-Fütterung</li><li>- sham-Operation: gleiche operative Intervention wie in Gruppe 5/6/7/8 aber kein H/R</li><li>- i. p. Injektion des Peptids D-JNKI-1</li></ul>
<b>3</b> n = 8	<b>EtOH sham</b> <b>NaCl</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lieber- DeCarli Diät-Fütterung</li><li>- sham-Operation: gleiche operative Intervention wie in Gruppe 5/6/7/8 aber kein H/R</li><li>- i. p. Injektion der Lösungsmittelkontrolle NaCl</li></ul>
<b>4</b> n = 4	<b>EtOH sham</b> <b>D-JNKI-1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lieber- DeCarli Diät-Fütterung</li><li>- sham-Operation: gleiche operative Intervention wie in Gruppe 5/6/7/8 aber kein H/R</li><li>- i. p. Injektion des Peptids D-JNKI-1</li></ul>
<b>5</b> n = 13	<b><i>Ctrl H/R</i></b> <b>NaCl</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Kontrolldiät-Fütterung</li><li>- H/R</li><li>- i. p. Injektion der Lösungsmittelkontrolle NaCl</li></ul>
<b>6</b> n = 7	<b><i>Ctrl H/R</i></b> <b>D-JNKI-1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Kontrolldiät-Fütterung</li><li>- H/R</li><li>- i. p. Injektion des Peptids D-JNKI-1</li></ul>
<b>7</b> n = 10	<b>EtOH H/R</b> <b>NaCl</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lieber- DeCarli Diät-Fütterung</li><li>- H/R</li><li>- i. p. Injektion der Lösungsmittelkontrolle NaCl</li></ul>
<b>8</b> n = 12	<b>EtOH H/R</b> <b>D-JNKI-1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lieber- DeCarli Diät-Fütterung</li><li>- H/R</li><li>- i. p. Injektion des Peptids D-JNKI-1</li></ul>

### 2.2.1.1 Modell der ethyltoxischen Fettleber / des chronischen ethyltoxischen Leberschadens am Versuchstier Maus durch Lieber-DeCarli Diät-Fütterung

Die verwendeten transgenen Mäuse haben den genetischen Hintergrund der C57Bl6 Maus, und wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Christian Jobin (Chapel Hill, North Carolina USA) zur Verfügung gestellt (*material transfer agreement*) und vor Ort in der Zentralen Forschungseinrichtung der Goethe Universität in Zucht übernommen. Bei dieser Mauslinie steht die Expression des *enhanced green fluorescence protein* unter der transkriptionellen Kontrolle von NF- $\kappa$ B cis Elementen. Eine Einzelkopie des NF- $\kappa$ B-abhängigen eGFP-Reporter Genes wurde nach 5' des Hypoxanthinganin-Phosphoribosyl Transferase-Gens inseriert. Nach der intrazellulären Bindung von NF- $\kappa$ B kommt es zur Transkription von eGFP, welches immunhistochemisch, durchflusszytometrisch oder auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann<sup>163</sup>.

Die C57Bl6 Mäuse sind anerkannte Versuchstiere zur Grundlagenforschung zum Leberschaden und werden häufig zu Untersuchungen von Alkoholeinfluss verwendet, da sie keine Abneigung gegen alkoholhaltige Fütterung haben, und die Alkoholaufnahme ohne Zwang erfolgen kann.

Die Tiere waren zu Beginn der Fütterung zwischen 6 und 8 Wochen alt, und hatten ein Gewicht von 20-30 g. Die Haltung erfolgte in separaten Filter Top-Käfigen in einem Air-Flow Haltungsraum mit 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus (von 7 bis 19 Uhr), sowie konstanter Raumtemperatur von 21-24°C, einer Luftfeuchtigkeit von 20-25%. Es wurden ausschließlich männliche Tiere im Versuch verwendet, um den Einfluss zyklusbedingter Hormoneinflüsse bei weiblichen Tieren auszuschließen. Trinkwasser stand den Tieren vor und während des Versuches *ad libitum* zur Verfügung. Zeigten sich bei den Tieren Hinweise auf unzumutbare Belastung oder Schmerzen wurden die Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen.

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Forschungseinrichtung der Universitätsklinik Frankfurt am Main gehalten. Die Tierhaltung erfolgte gemäß tierschutzrechtlichen Haltungsbedingungen. Der entsprechende Tierversuchsantrag (interne Kurzbezeichnung: AIFL-NF- $\kappa$ B-Maus)

## Material und Methoden

---

wurde von der Landesregierung Hessen/Regierungspräsidium Darmstadt unter folgender Genehmigungsnummer genehmigt: V 54 –19 c 20/15 – F3/10.

### 2.2.1.2 Herstellung der Lieber-DeCarli Diät

Die Lieber-DeCarli Flüssigdiät wurde jeweils frisch aus vorgefertigtem Trockenfutter, Maltodextrin, H<sub>2</sub>O und je nach Protokoll mit aufsteigendem Ethanolgehalt hergestellt. Zuerst wurde die nach der unten folgenden Tabelle vorgesehene Menge Lieber-DeCarli Trockendiät und Maltodextrin abgewogen, und die entsprechende Menge H<sub>2</sub>O dazugegeben. Die Mischung wird mit einem handelsüblichen Stabmixer homogenisiert bis keinerlei Klumpen mehr vorhanden sind. Wird eine ethanolhaltige Diät hergestellt, wird unvergälltes Ethanol dazugegeben, die Menge an Maltodextrin wird dementsprechend verringert. Die vorbereitete Flüssigdiät wird in 50 ml Zentrifugationsröhrchen aliquotiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Nach Zubereitung ist die Diät bei 4°C für 2-3 Tage haltbar.

**Tabelle 6: Verwendete Materialien für die Herstellung der Flüssigdiät.**

EtOH Konzentration [% (v/v0)]	0,50%	1,75%	2,63%	3,50%	4,38%	6,26%
Trockenfutter [g]	6,61	6,61	6,61	6,61	6,61	6,61
Maltodextrin [g]	4,48	3,22	2,6	1,95	1,34	0
H <sub>2</sub> O [ml]	38,91	38,28	38,46	38,67	38,83	40,22
EtOH [ml]	0	0,89	1,33	1,77	2,22	3,17
Endvolumen [ml]	50	50	50	50	50	50

### 2.2.1.3 Chronische Alkoholfütterung der Tiere – Paarfütterung

Die Versuchstiere wurden zu Versuchsbeginn einzeln in Käfigen, die mit speziellen Futterröhrchen (*feeding tubes*) für Flüssignahrung ausgestattet wurden, untergebracht. Das nachfolgend beschriebene Fütterungsregime wurde über den Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt. Hierbei erhielten die Tiere eine Flüssigdiät mit regulärem Fettgehalt (17,8% der Gesamtkalorien) und geringem Vitamin A-Anteil (Lieber-DeCarli Diät), um zu gewährleisten, dass eine Leberverfettung hauptsächlich durch den der Flüssigdiät zugefügten Ethanolgehalt verursacht wird.

## Material und Methoden

Vor Beginn des Versuches wurden die Tiere randomisiert dem Versuchsmerkmal Lieber-DeCarli Diät (ethanolhaltig), Kontrolldiät (ethanolfrei) und auch in Paare zugeteilt. Alle Tiere wurden dann für 2 Tage als „Gewöhnungsphase“ mit der ethanolfreien Flüssigdiät gefüttert. Nachfolgend erhielt die Lieber-DeCarli Diät Gruppe eine Flüssigdiät, welche mit graduell ansteigenden Ethanolvolumina versetzt wurde. Beginnend mit 1,75% v/v Ethanol wurde der Alkoholgehalt schrittweise nach dem in der Literatur vorbeschriebenem Regime gesteigert, bis ein Anteil der Kalorienzufuhr von 36 Prozent durch den Ethanolgehalt in der Diät (6,25% v/v) gedeckt wurde (s. Tab. 7).

**Tabelle 7: Fütterungsregime über 4 Wochen, Alkoholgehalt der Nahrung in % (v/v0).**

Woche 1							Woche 2							Woche 3							Woche 4													
1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7							
1,75 %							2,63 %							3,5 %							4,38 %							6,26 %						

Um zu gewährleisten, dass die zugeordneten Kontrolltiere das gleiche metabolische Niveau haben, wurde eine Paarfütterung durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere zu Beginn bereits in Pärchen randomisiert, wobei ein Tier die Lieber-DeCarli Diät erhielt, und das andere Tier eine isokalorische Menge an ethanolfreier Diät zur Verfügung gestellt bekam. Den Tieren der Ethanol-Diät-Gruppe wurde die Diät *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Menge der ethanolhaltigen Diät, welche das Ethanol-Tier aufgenommen hatte, wurde am Folgetag bilanziert, und dem Kontroll-Tier die dementsprechende Menge an ethanolfreier Kontrolldiät bereitgestellt. Die Kaloriendifferenz des Alkoholanteils der ethanolhaltigen Flüssigkeitsdiät wurde dabei durch Kohlenhydrate (Maltose-Dextrin-Gemisch) äquikalorisch ersetzt. Alle Tiere wurden täglich zwischen 16:00 und 18.00Uhr mit der entsprechenden Diät gefüttert, die ihnen dann für die nächsten 24 h zur Verfügung stand. Täglich wurde dabei das Körpergewicht kontrolliert, und die Tiere hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes beurteilt. Während des gesamten Zeitraumes des Versuches hatten alle Versuchstiere fortwährend freien Zugang zu Wasser.

### 2.2.1.4 Modell des Hämorrhagischen Schocks / Reperfusion am Versuchstier Maus - Operative Prozedur

#### 2.2.1.4.1. Katheterisierung der *Aa. femorales*

Zwecks des invasiven hämodynamischen Monitorings des arteriellen MAP-Wertes und der kontrollierten Hypovolämie erfolgte zu Versuchsbeginn die Katheterisierung beider *Arteriae femorales*. Zu Beginn jedes Versuches wurde ein Operation-Dokumentationsprotokolls angelegt. Die Versuchstiere wurden mittels Isofluran-Inhalationsnarkose narkotisiert und in Rückenlage unter Pflasterfixierung der unteren Extremität auf einer regulierbaren Wärmematte gelagert. Zum Schutz der Corneae wurde Augensalbe aufgebracht. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch ein offenes Narkosesystem ebenfalls mit Isofluran. Die Mäuse wurden hierzu mit dem Kopf in einer speziellen Maske, welche eine kontinuierliche Applikation von volatilen Anästhetika, bei gleichzeitige Absaugung des überschüssigen Narkosegases ermöglicht, und die mit dem Narkosegerät verbunden ist, platziert. Die Flussrate des Narkosegases betrug ca. 0,5-0,7 l/min, bei einer Isofluran- Konzentration 1-2,0%, und wurde jeweils nach Bedarf angepasst, bis eine ausreichende Narkosetiefe erreicht wurde. Durch Einbringen einer rektalen Temperaturmesssonde wurde kontinuierlich die Körpertemperatur des Versuchstieres gemessen und die Temperatur durch Anpassung der Wärmematte sowie einer Wärmelampe zwischen 35 - 37°C reguliert.

Das gesamte Operationsgebiet wurde mittels Enthaarungscreme von Fell befreit und anschließend dreimalig desinfiziert. Hiernach erfolgte die Infiltration des OP-Zugangsgebietes mit dem langwirksamen Lokalanästhetikum Carbostesin 0,25%. Dann wurde die Haut und das Unterhautfettgewebe durch zwei ca. 1 cm lange Schnitte beidseits eröffnet, und die Wundfläche mit steriler NaCl Lösung vor Austrocknung geschützt. Der Hautschnitt erfolgte dabei von inguinal nach distal dem Gefäß-Nervenstrang folgend.

Die weiteren Schritte erfolgten unter dem OP Mikroskop bei 1,6x 12-facher Vergrößerung: Alle beschriebenen Schritte erfolgen seitengleich an der rechten und linken unteren Extremität.

Die *Arteria femoralis* wurde jeweils unter Separation von der *Vena femoralis* und des *Nervus femoralis* im proximalen und distalen Zugangsbereich über eine

## Material und Methoden

---

kurze Strecke von ca. 3 mm freipräpariert. In diesen Bereichen wurde je proximal und distal eine Ligatur der *A. femoralis* mit Seide 5-0 vorgelegt. Die distal vorgelegte Ligatur der *Arteria femoralis* wurde nachfolgend verschlossen, und das Gefäß hierdurch gestaut. Aufgrund ausreichender Kollateralgefäße kam es hierdurch bei keinem der Versuchstiere zu einer Hypoxie/Nekrose der betroffenen Extremität. Die Arterie wurde durch das Setzen eines Gefäß-Klemmchens oberhalb des proximal vorgelegten Knotens auf die *Arteria femoralis* (atraumatisch) verschlossen.

Für die eigentliche Kanülierung erfolgte das weitere Vorgehen nun unter 2,5x 12-facher Vergrößerung. Die Gefäßkatheter wurden zur Vermeidung von Luftembolien mit heparinierter NaCl-Lösung durchgespült. Der distal isoliert freigelegte Gefäßabschnitt der *Arteria femoralis* wurde mit einem Spatel unterfahren, und die Arterie mit einer vorgebogenen G 30-Hohlnadel punktiert. Nach der Punktion wurde der vorbereitete Katheter in das Gefäß eingeführt. Unter 1,6x 12-facher Vergrößerung wurde die proximale Gefäßklemme geöffnet und der Katheter weiter vorgeschoben bis über die proximal freigelegte Stelle. Der Katheter wurde im Gefäß durch Anziehen der proximalen Ligatur und durch Fixation an der distalen Ligaturstelle befestigt. Die Katheterlage wurde durch Anspülen und Aspiration überprüft. Während der Präparation wurde die Wundfläche durch intermittierende Applikation von Flüssigkeit (NaCl) zur Vermeidung einer Austrocknung benetzt.

Trat bei der Präparation oder Katheterisierung eine Blutung auf, wurde diese durch Druck oder elektronische Koagulation gestillt, wobei Versuchstiere, welche bereits einen starken Blutverlust bei der Präparation erlitten hatten aus dem Versuch ausgeschlossen wurden (initialer MAP zu niedrig. Im Durchschnitt < 50 mmHg während 10 Minuten Beobachtungszeitraum).

### 2.2.1.4.2. Durchführung des hämorrhagischen Schocks/Reperfusion nach erfolgter Katheterisierung

Nach erfolgreicher Katheterisierung und Kalibrierung der Blutdruckmessung zur Atmosphäre hin wurde einer der Katheter an den Druckdom angeschlossen. Der Mittlere arterielle Druck (MAP) wurde während des kompletten Versuchverlaufs mittels einer auf einen Laptop aufgespielten Dokumentationssoftware



## Material und Methoden

---

aufgezeichnet (alle 10 sec). Der zweite Katheter diente der Auslösung und Aufrechterhaltung des hämorrhagischen Schocks.

Dafür wurde der Katheter mit einer heparinisierten Spritze konnektiert und innerhalb von 5 Minuten durch das vorsichtige Abziehen von Blut unter ständiger RR-Kontrolle (Im Normalfall ca. 0,25 ml- 0,35 ml Blut initial) der Druck auf unter 40 mmHg abgesenkt. Der mittlere arterielle Druck wurde nun durch Aspiration/Transfusion für 90 Minuten kontinuierlich bei einem Zielwert 32 mmHg gehalten. Während der 90-minütigen Schockphase wurden die Wundflächen feucht gehalten, die Katheterlage und Temperatur kontrolliert und die Narkosetiefe entsprechend angepasst.

Vor Beginn der Reperfusionphase wurde entweder die nach Körpergewicht berechnete Dosis D-JNKI-1 (11 mg/kg, intraperitoneal, i. p.) oder in der Kontrollgruppe NaCl mittels i. p. Injektion im linken unteren Quadranten appliziert. Nach Abschluss der 90 Minuten wurde die Maus mit 60% des maximal entnommenen Blutvolumens innerhalb von 5 Minuten und 50% des maximal entnommenen Blutvolumens in Form von Ringerlösung innerhalb der nächsten 25 Minuten reperfundiert.

Die beiden Katheter wurden unter Verschluss der proximal vorgelegten Ligatur der Arteria femoralis entfernt. Zum sicheren Verschluss der Arteriae femorales erfolgte eine 3. Ligatur knapp oberhalb der Punktionsstelle. Zur erneuten Schmerztherapie wurden die Wundränder mit Carbostesin 0,25% nochmals infiltriert und die Wunden durch Einzelknopf-Hautnaht verschlossen. Für die Aufwachphase wurden die Versuchstiere in Bauchlage verbracht und die Isofluran-Zufuhr beendet. Nach einer ausreichenden (mindestens 60-minütigen) kontinuierlichen Überwachung mit Wärmezufuhr wurden die Tiere in den Käfig rückverbracht. Voraussetzung hierfür war ein normales Bewegungsmuster, erfolgte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme und ein „normales Verhalten“. Über den gesamten Versuchsverlauf erfolgte die schriftliche Dokumentation relevanter Versuchsparameter.

### 2.2.1.4.3 Vorgehen bei der Kontrollgruppe

Bei Tieren die der sham-Gruppe angehören, wurde die operative Prozedur der Katheterisierung analog wie bei den Schock-Tieren durchgeführt. Der zweite Katheter wurde auch an eine heparinisierte Spritze konnektiert, aber kein Blut aspiriert oder eine weitere Manipulation durchgeführt. Auch die Interventionen während der Reperfusion-Phase entfallen, wobei die Kontrollgruppe über die Dauer der Reperfusion-Phase weiter in Narkose gehalten wurde, um die gleiche Narkoselänge wie bei der Interventionsgruppe zu garantieren. Die Aufwachphase der Kontrollgruppe gestaltet sich analog zur Interventionsgruppe.

### 2.2.1.4.4 Organentnahme und Probenkonservierung

Die Probengewinnung erfolgte 2 Stunden nach Ende der Reperfusion. Die Versuchstiere wurden mit Isofluran anästhesiert. Das Körpergewicht wurde erneut bestimmt, und die Maus unter die Narkosemaske gelegt – die Dosierung des Narkosegaszuflusses wurde bis zu einer Asphyxie auslösenden Dosis gesteigert. Währenddessen wurde die Bauchdecke in einem groß angelegten V-förmigen Schnitt vom Unterbauch bis zum Thorax links und rechts komplett eröffnet und die ventrale Bauchdecke hochgeklappt. Die *V. cava inferior* wurde zur möglichst kompletten Blutentnahme mit einer 2 ml Spritze 25G Kanüle punktiert, das Blut aspiriert und auf Eis gelagert (Blutvolumen: ca. 0,6-1 ml).

Das tief narkotisierte Tier wurde durch das Entbluten über die *V. Cava inferior* getötet, die *V. cava inferior* wurde anschließend scharf durchtrennt, und die Leber und der gesamte Blutkreislauf mit Ringer-Lösung über die *V.a. cava inferior* mit einer Braunüle perfundiert. Nach Entnahme der Lavage wurde die Leber in Gänze abgesetzt, das Lebergewicht bestimmt und das entnommene Organ auf Eis gelagert.

Eine zweite bei der Entnahme assistierende Person präparierte die Leberlappen voneinander, wobei der rechte große Leberlappen abgetrennt, mit 10% Zn-Formalin perfundiert wurde, und dann *in toto* in eine Einbettkassette verbracht wurde. Die Einbettkassette wurde für 16-20 Stunden bei Raumtemperatur in 10% Zn-Formalin und anschließend bis zur endgültigen Aufbereitung in 70%-igem Ethanol gelagert. Der mediane Leberlappen wurde in ein Kryoförmchen mit Tissue-Tek® eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C asserviert. Hier erfolgte später die Herstellung von Kryoschnitten. Die restlichen

Leberanteile wurden in kleinere Stücke zertrennt und auf mehrere Kryotubes zur späteren Protein- und RNA-Isolierung konserviert.

### 2.2.2 Kontrollparameter des Versuchsablaufes

#### 2.2.2.1 Hämodynamik des Hämorrhagischen Schocks

Der mittlere arterielle Druck (MAP) wurde als hämodynamischer Parameter während des Versuches kontinuierlich alle 10 sec aufgezeichnet. Für die Dokumentation wurde eine Computersoftware (Digi-Med® System Integrator™ Model 400; FA Micro-Med, Inc) verwendet. Die aufgezeichneten MAP-Werte wurden mittels Excel-Tabelle zusammengestellt, und wie unter 2.2.7 Statistik beschrieben, ausgewertet.

#### 2.2.2.2 *Liver to body weight* Ratio (LBR)

Zu Beginn der Organentnahme wurde das Körpergewicht des jeweiligen Tieres nach Einleitung der Narkose bestimmt. Nach Entnahme der Leber durch den Operateur wurde die Leber gewogen. Aus den beiden ermittelten Werten wurde das Verhältnis Leber zu Körpergewicht = *Liver to body weight* Ratio (LBR) errechnet:

Formel:

$$\text{Liver to Body weight Ratio (LBR)} = \text{Lebergewicht/Körpergewicht} \times 100 [\%]$$

### 2.2.3 Nachweis von Organschäden

#### 2.2.3.1 Bestimmung der AST-/ALT- und CK -Konzentrationen im Plasma

Die Serum-Konzentrationen relevanter Leberparameter, stellvertretend der Transaminasen Aspartat Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) als Marker für einen hepatischen Gewebeschaden, und der unspezifischen Creatinkinase (CK) stellvertretend als Marker für einen Schaden von Skelettmuskulatur/ Herzmuskulatur, wurden aus dem Serum der Blutproben

bestimmt. Nach der Entnahme des Vollblutes wurde dieses für 10 Minuten bei 1358 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und bis zur Bestimmung bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Transaminasen erfolgte unter Verwendung eines Trocken Chemie Systems (Kodak Ektachem Analysator DT 60 und dem Zusatzmodul DTSC der Firma Johnson & Johnson) im Institut für Ökologie, Evolution & Diversität im Arbeitskreis Stoffwechselphysiologie der Universität Frankfurt. Für die Bestimmung wird zuerst eine Verdünnungsreihe mittels Serum und NaCl-Lösung hergestellt. Das Analysegerät funktioniert mittels vorgefertigter Analyseplättchen für die einzelnen Laborparameter, welche bei 4°C gelagert werden müssen. Das entsprechende Analyseplättchen für die gewünschten Parameter (AST/ALT/CK) wird in das DTSC eingelegt und nach einer Aufwärmphase wird das Serum mittels einer Vitros DT Pipette auf das Plättchen aufgebracht, worauf das Gerät die Serum-konzentration in U/L bestimmt.

### 2.2.3.2 Gewebeaufbereitung für histologische und immunhistochemische Färbungen

Die für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen bestimmten Leberlappen werden nach der Entnahme aus dem 70%igen Ethanol wie folgt bearbeitet. Für die Herstellung von Paraffinblöcken werden die Leberlappen mit verschiedenen konzentrierten Alkohollösungen (absoluter Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol), Xylol und anschließend Paraffin, dies findet für 21 Stunden in einem geschlossenen Gewebeeinbettungsautomaten (Hypercenter) nach einem vorgegebenen Programm statt, durchtränkt. Wenn dieser Schritt abgeschlossen ist, wird das Gewebestück mit flüssigem Paraffin (ca. 60°C) in kleine Blöcke gegossen, und anschließend auf einer Kühlplatte bei -10°C für ca. 24 Stunden zum Aushärten gebracht. Nachdem die Blöcke ausreichend gehärtet sind, werden unter Verwendung eines Schlittenmikrotoms, 7 bzw. 4 µm dicke Einzelschnitte angefertigt, und auf die Objektträger gebracht. Die Objektträger mit den so gefertigten Organschnitten werden dann an der Luft und dann noch für ca. 60 Minuten im Ofen getrocknet damit die Schnitte ausreichend an den Objektträgern fixiert werden.

### 2.2.3.3 Darstellung der Lebermorphologie mit der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Hämatoxylin Eosin-Färbung ist das am häufigsten verwendete Färbeverfahren in der Histologie, mit dem die verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können, welche zur Beurteilung der Lebermorphologie beziehungsweise Lebergewebeschädigungen routinemäßig eingesetzt wird.

#### 2.2.3.3.1 Entparaffinierung

Für die HE Färbung werden Paraffinschnitte mit 7 µm Dicke verwendet. Zu Beginn und nach der Färbung durchlaufen die Histologiegewebeschnitte eine ab- und aufsteigende Alkoholreihe nach dem nachfolgend geschilderten Procedere: Vor und nach den jeweiligen Färbungen müssen die Schnitte die absteigende beziehungsweise aufsteigende Alkoholreihe gemäß dem in Tab. 8 dargestellten Schema durchlaufen.

**Tabelle 8: Schema der Alkoholreihe (gültig für alle Färbungen).**

<b>Reihenfolge absteigend</b>	<b>Reihenfolge aufsteigend</b>	<b>Verweildauer</b>	<b>Substanz</b>
1	4	3 x 5 min	Xylol
2	3	2 x 5 min	Alkohol absolut
3	2	2 x 3 min	Alkohol 95%
4	1	1 x 3 min	Alkohol 70%
5		> 5 min	dH <sub>2</sub> O

#### 2.2.3.3.2 Kern-Plasma-Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Zur Anfärbung der Leberschnitte mit HE werden die wie zuvor beschrieben angefertigten Objektträger in Glasschälchen für 10 Minuten in Hämatoxylin (HTX) inkubiert und im Anschluss für wenige Sekunden in Aqua dest. gegeben. Danach werden die Schnitte in Scott-Puffer verbracht (destilliertes Wasser mit 0,2 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat und 2 % (w/v) Magnesiumsulfat) für 10 Minuten, darauf folgt nochmals kurzes Abwaschen mit Aqua dest. Nun inkubiert man die Gewebeschnitte 3 Minuten lang mit 0,5%igem Eosin G (0,5%iges Eosin G; 1

Tropfen Eisessig pro 100 ml Eosin). Danach durchlaufen die Schnitte erneut nach dem oben beschriebenen Schema die aufsteigende Alkoholreihe.

### 2.2.3.3.3 Eindecken der Schnitte

Die so angefärbten Schnitte werden nun eingedeckt. Nachdem die Schnitte aus dem Xylol-Bad kommen, werden sie mit 2 Tropfen Eukitt® Einschlussmittel bedeckt und ein Deckglas aufgebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen unter dem Deckglas verbleiben. Das überschüssige Einschlussmittel wird dann durch kurzes Bad in Xylol entfernt und die Schnitte zum Trocknen belassen.

### 2.2.3.3.4 Auswertung der Färbung

Nachdem die Schnitte getrocknet sind, wurden die HE gefärbten Schnitte unter dem Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 5x10 und 20x10 ausgewertet. Dabei wurde das Gewebe von zwei unabhängig auswertenden Personen doppelt verblindet bezüglich der histologischen Lebergewebeschädigung bewertet. Zur Beurteilung der Lebergewebeschädigung orientierten wir uns an der Ausprägung der vorhandenen Nekrosen, dem Vorhandensein von pathologischer Lebermorphologie, dem Vorhandensein von Vakuolen, eventueller Zellschwellung oder dem Zellkernverlust. Nach diesen genannten Kriterien wurden die Einzelschnitte in Gruppen eingeteilt.

## 2.2.4 Nachweis eines inflammatorischen Geschehens

### 2.2.4.1 Bestimmung der Zytokin-Level im Serum (IL-6, TNF- $\alpha$ )

Die systemischen Spiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  wurden im Serum durchflusszytometrisch bestimmt. Die Analysen erfolgten am FACSCalibur unter Verwendung des Mouse IL-6 bzw. TNF- $\alpha$  Flex Set mittels „Cytometric Bead Array“ (CBA, BD Bioscience) nach Angaben und dem Protokoll des Herstellers.

### 2.2.4.2 Bestimmung der Zytokin-Level im Lebergewebe

#### 2.2.4.2.1 Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die quantitative Bestimmung der Konzentrationen des hepatischen IL-6 wurde ein *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Dieses immunologische Nachweisverfahren basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. In einem Sandwichverfahren wird das nachzuweisende Antigen zwischen zwei Antikörpern eingebettet. Der Erstantikörper, der gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist, ist auf einer Mikrotiterplatte an die Wellenböden gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird in die Wellenböden der Mikrotiterplatte aufgebracht und inkubiert, wobei sich das Antigen konzentrationsabhängig an den Erstantikörper der Platte bindet. Ungebundene Probenanteile werden durch Waschschriffe entfernt und ein Zweitantikörper aufgetragen, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. An den zweiten Antikörper ist außerdem eine Meerrettich-peroxidase gebunden. Nach einem erneuten Waschschriff, wird eine farblose Substratlösung auf die Mikrotiterplatte appliziert wodurch durch die Meerrettich-peroxidase ein farbiges Produkt entsteht, das dann photometrisch quantifiziert werden kann. Dabei entspricht die Menge des nachzuweisenden Antigens proportional der Farbintensität des Farbproduktes. Nach einer definierten Reaktionszeit wird die enzymatische Reaktion mit einer Säurelösung gestoppt.

Wir verwendeten für den Nachweis von IL-6 ein Testsystem von R&D System. Die Proben zur Bestimmung wurden mit Aqua dest. auf einen Proteingehalt von 50 µg/µl verdünnt. In jede Vertiefung wurden 50 µl Assay Diluent RD 1-14 sowie 100 µl Probe/ Standard/ Spike oder Blanc pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt, vorsichtig für 1 Minute geschwenkt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit aus den Vertiefungen aspiriert und der erste Waschschriff durchgeführt. Dabei wurde in jede Vertiefung 400 µl Waschpuffer gefüllt und anschließend wieder aspiriert, diese Schritte wurden 5 Mal wiederholt. Nun werden 100 µl des sekundären Antikörpers in jede Vertiefung gegeben, abgedeckt, geschwenkt und wiederum für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt der zweite Waschschriff analog wie zuvor. 100 µl Substratlösung werden zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschirmung inkubiert. Anschließend wird 100 µl Stop-Solution aufpipettiert und die Platte vorsichtig geschwenkt. Dann wurde photometrisch die Farbintensität und damit die

## Material und Methoden

---

Konzentration von IL-6 mittels eines Microplate-Readers (Infinite M2000, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm bestimmt.

### 2.2.5. Untersuchung von Transkriptionsfaktoren c-Jun/NF- $\kappa$ B

#### 2.2.5.1 Proteinisolierung aus Lebergewebe

##### 2.2.5.1.1 Proteinextraktion aus Gewebeproben

Die Proteinisolierung erfolgte durchgehend auf Eis oder bei 4°C (Zentrifugation). Hierzu werden Precellys Keramik Tubes beschriftet, mit 600  $\mu$ l Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tbl. 9) befüllt und auf Eis gestellt. In jedes Tube wird ein Organstück des bei -80°C konservierten Lebergewebes zugegeben. Anschließend wird das Lysat im Homogenisator - *precellys24 lysis & homogenization* – zweimal je 20 Sekunden bei 6500 rpm homogenisiert. Das Lysat wird im Anschluss in Eppendorf-cups umpipettiert und dabei nochmals 10-fach mittels einer Insulinspritze aufgezogen. Danach wird das Lysat bei 13000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Proteinüberstand wird in Eppendorf-Röhrchen aliquotiert und bei -80°C bis zur späteren Untersuchung asserviert. Im Anschluss erfolgte die Proteingehaltbestimmung aus einem Teil des Überstandes.

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Lösung zur Zelllyse.**

Lösung	Zusammensetzung (Endkonzentrationen)
Lysepuffer	Tris-HCl #A1086 - 50mM pH 7,4 NP-40 #155942 - 1% Na-deoxycholate - 0,25% NaCl #31434 – 150 mM EDTA #1073 J.T. – 1 mM Aprotinin #A-1153 -1 $\mu$ g/ml Leupeptin #L2023 – 1 $\mu$ g/ml Pepstatin #P4265 – 1 $\mu$ g/ml



---

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> #56508 – 1 mM

NaF #S-1504 – 1 mM

PMSF #6367.1 – 1 mM

---

### 2.2.5.1.2 Proteinquantifizierung

Durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau an kationische und nichtpolare hydrophobe Seitenkette der Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes proportional zur Proteinmenge. Vom Überstand aus der zuvor geschilderten Proteinisolation wurden je 5 µl in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben, im Verhältnis 1:100 mit 495 µl destilliertem Wasser verdünnt und gründlich gemischt, sodass die gemessene Absorption innerhalb der vorgegebenen Standardkurve lag. Es wurden je 10 µl auf eine 96-Well- Mikrotiterplatte gegeben und mit 300 µl Coomassie- Brillant- Blue blasenfrei aufgefüllt. Die Mikrotiterplatte wurde dann ca. 5 sec auf den Schüttler gestellt und für 10 Minuten inkubiert. Zusätzlich wurde ein Blindwert, der statt der Probe Aqua bidest. enthält hergestellt. Die Absorption der Probe wurde bei 595 nm und 25°C gegen den Blindwert spektralphotometrisch gemessen. Der Proteingehalt der Proteinsuspension wurde mittels einer linearen Eichkurve gemessen.

### 2.2.5.2 Quantifizierung der c-Jun/NF-κB Expression mittels Western Blot

Der Western Blot ist ein Standardverfahren zum Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen. Dieser umfasst die Einzelschritte der Proteinauftrennung, Proteintransfer, Proteindetektion und schließlich die Immundetektion der Ziel-Proteine.

#### 2.2.5.2.1 *Sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE zur Proteinauftrennung)

Die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE Gel-Elektrophorese erfolgt anhand des elektrischen Potenzials der Proteine. Die Moleküle wandern hierbei durch eine Gelmatrix aus Acryl- und Bisacrylamid. Durch eine Kettenreaktion bildet Acrylamid langkettige Polymere aus, welche durch Bisacrylamid

## Material und Methoden

---

miteinander vernetzt werden. Freie Radikale (Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat = APS) und der Katalysator TEMED (= N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin) unterstützen und beschleunigen diese Polymerisation. Durch die Anlagerung von SDS (= Natriumdodecylsulfat) an die Proteine, denaturieren diese und werden entsprechend ihrer Molekülgröße gleichmäßig negativ aufgeladen. Nachdem das Gel mit den Proteinen in ein elektrisches Feld gebracht wird beginnen die Proteine entsprechend ihrer Ladung, also ihrer Molekülgröße durch das Gel zu wandern und dabei aufzutrennen.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden zwei gereinigte Glas-Gelplatten in die entsprechende Halterung eingesetzt. Für die Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde für die spätere Inkubation mit dem Antikörper ein 12%iges Trenngel (für Proteine zwischen 40 und 100 kD) bis ca. 1 cm unterhalb des Glasrandes eingegossen und mit Isopropanolol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanolol abgegossen, mit Aqua dest abgespült und ein 4%igem Sammelgel nach Laemmli (1970) darübergegossen. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in der Tabelle 10 aufgeführt. Nun wird ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt um auf diese Weise die Taschen für die Proteinproben zu bilden. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele aus der Halterung genommen, in die Gelelektrophoresekammer eingebracht und die Kämmen wurden entfernt.

Die Geltaschen wurden mit Elektrophorese-Puffer befüllt, wobei die Gelkammern nochmals auf ihre Intaktheit überprüft wurden. Die erste sowie die letzte Geltasche wird mit einem Größenstandard befüllt. Dieser Marker besteht aus einem vorgefärbten Proteingemisch und dient der Erkennung der molekularen Masse der detektierten Proteine. Wir wählten einen zweifarbigen (blau/pink) Marker (Precision Plus Protein Dual color Standards; BIO-RAD) wobei dieser Marker eine Proteindetektion von 10-250 kDa ermöglicht.

Die Proteinproben werden für 5 Minuten in einem Heizblock bei 95°C denaturiert und für wenige Sekunden zentrifugiert. Im Anschluss werden die Proteinproben (50 µg pro Spur) in die Geltaschen pipettiert.

Nach Befüllen der Geltaschen erfolgt die Proteinauftrennung durch Elektrophorese bei RT in 1x Elektrophorese-puffer für 40 Minuten bei einer Spannung von 60 V (PowerPac 300 Power Supply), im Anschluss, wenn die Proben

## Material und Methoden

---

das Sammelgel durchlaufen hatten, und in das Trenngel eintreten, wurde die Spannung auf 90 V erhöht (insgesamt 2,5 Stunden).

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Elektrophoresegele.**

Komponente	Sammelgel 4%	Trenngel 12%
Acrylamid A	1,3 ml	3,9 ml
ddH <sub>2</sub> O	5,4 ml	1,75 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
Sammelgel Puffer [1,125 M Trispuffer (pH 6,8)]	2,5 ml	-
Bisacrylamid B	0,6 ml	1,8 ml
APDS 10%	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl
Trenngel-Puffer [1,125 M Trispuffer (pH 8,8)]	-	2,5 ml

### 2.2.5.2.2 Western-Hybridisierung (Western Blot)

Nach der oben beschriebenen SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Trenngel mit Hilfe des Western Blots auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Zur Durchführung des Proteintransfers wird das SDS-Gel aus der Elektrophorese-kammer genommen und die Glasplatten vorsichtig entfernt. Das Sammel-Gel mit den Taschen wird entfernt, sodass nur noch das Trenn-Gel mit den darin enthaltenen Proteinen vorliegt. Die Membran sowie mehrere Lagen Blottingpapier wird auf die dem Trenn-Gel entsprechende Größe zurechtgeschnitten. Das Blottingpapier und die Hybondmembran sowie zwei Schwammtücher werden mit Transferpuffer benässt. Die Blotkammer wird nun mit der Reihenfolge Anode – Schwammpapier 2 Lagen Blottingpapier – Hybond-Membran – Trenn-Gel – Schwammpapier 2 Lagen Blottingpapier – Kathode besetzt, hierbei wird darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten eingeschlossen werden. Der Western-Transfer erfolgt bei einer Spannung von 100 V für 60 min.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Lösungen zur Proteinauftrennung.**

Lösungen	Zusammensetzung
Laufpuffer	0,25 M Tris, pH 8,3 1,92 M Glycin 0,1% SDS 2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1% CaSO <sub>4</sub> 2% Kupfer-Na-Tartrat 50% Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
Probenpuffer	Laemmli-Probenpuffer (2x Laemmli Puffer vor Gebrauch mit β-Mercaptoethanol versetzt)
Transferpuffer	23 mM Tris

### 2.2.5.2.3 Antikörperhybridisierung

Im Anschluss an den Transfer können die gewünschten Proteine immunochemisch mittels proteinspezifischer Antikörper (Primärantikörper) nachgewiesen werden. Die Antikörperbindung kann man mit sekundären gegen den Primärantikörper gerichteten Antikörpern, welche an Meerrettich-peroxidase (auch als HRP = *horse radish peroxidase* bezeichnet) gebunden sind, visuell darstellen. Die Meerrettich-peroxidase ist ein Enzym, welches Luminol in seine oxidierte Form überführen kann. Die während dieser oxidativen Reaktion entstehende Lumineszenz kann anschließend mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

**Tabelle 12: Verwendete Antikörper zur Western Blot-Analyse.**

Antikörper	Verdünnung
Phospho-NF-κB p65 (rabbit)	1:750
NF-κB p65 (rabbit)	1:750
Phospho c-jun (rabbit)	1:750
c-jun (rabbit)	1:750

## Material und Methoden

---

Antikörper	Verdünnung
horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti rabbit)	1:5000
anti- $\beta$ -actin (mouse)	1:2000
<i>horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody</i> (goat anti mouse)	1:5000

Nach dem Blot wird die Membran mit Towbin-Puffer gewaschen. Die Membran wird dann für 45 Minuten in Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese Inkubation werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen blockiert und damit die unerwünschte unspezifische Bindung des Primärantikörpers minimiert.

Als Erstantikörper werden c-Jun/phospho c-Jun und NF- $\kappa$ B p65/phospho NF- $\kappa$ B p65 verwendet. Die Membran wird mit 10 ml Primärantikörper-Antikörperpuffer bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung auf einer Schaukelwippe für 20 Minuten inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Primärantikörper ist zuvor in Antikörperpuffer gelöst worden. Am nächsten Tag wurde die Membran vor den weiteren Schritten nochmals für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach dieser Inkubation wird die Primärantikörper-Pufferlösung abgegossen und der bis dahin nicht gebundene Erstantikörper durch gründliches Waschen mit Blot-Puffer entfernt (3-mal je 15 Minuten). Die Membran wird nun für 45 Minuten mit einer Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Sowohl für c-Jun/phospho c-Jun (pc-Jun) als auch für NF- $\kappa$ B p65/phospho NF- $\kappa$ B (pp65) wird als Erstantikörper ein im Kaninchen hergestellter Antikörper, welcher gegen die Ziel-Proteine gerichtet ist, verwendet; der Zweitantikörper, welcher mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, wurde in Ziegen hergestellt und ist gegen den Kaninchen-Antikörper gerichtet. Nach Abschluss dieser Inkubation folgen erneute Waschschritte (Blot-puffer), um den überschüssigen nicht gebundenen Zweitantikörper zu entfernen, und damit eine scharf umgrenzte Lumineszenz zu erreichen, jeweils 3 Mal für 15 min und abschließend mit Aqua bidest. für 5 Minuten gespült. Als quantitative Kontrolle wurde Beta-Actin in analoger Art und Weise bestimmt.

**Tabelle 13:** Pufferlösungen zur Proteindarstellung und ihre Zusammensetzungen.

Lösung	Zusammensetzung
Antikörperpuffer	0,5% BSA 150 mM NaCl 1 mM Tris, pH 7,4 0,5% Tween 20
Blockierlösung	10% Magermilchpulver 150 mM NaCl 1 mM Tris, pH 7,4
Blot-Puffer	150 mM NaCl 1 mM Tris, pH 7,4 0,5% Tween 20
Towbin-Puffer	150 mM NaCl 1 mM Tris, pH 7,4

### 2.2.5.2.4 Chemolumineszenz

Zur visuellen Abbildung der antikörpermarkierten Proteinbanden erfolgt nun die Chemilumineszenzfärbung. Wenn Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase in seine oxidierte Form überführt wird, kommt es zur Emission von Licht der Wellenlänge 428 nm, wobei die Stärke der Lichtemission in direkt proportionalem Zusammenhang mit der Menge des entsprechenden Proteines steht. Die stattfindende Lichtemission wird dann mittels des Fusion Fx7 (PeqLab) dokumentiert. Die Nitrozellulosemembran wird für 1 Minuten mit Chemolumineszenz Lösung (1 ml ECL™-Lösung A mit 1 ml ECL™-Lösung B) inkubiert, die danach möglichst vollständig entfernt wird. Die durch Chemolumineszenz detektierbaren Banden können mittels des Fusion Fx7, bei einer Belichtungszeit von 30 sec, aufgezeichnet werden. Die Dichte der einzelnen Banden wird mittels der Software *Multianalyst* (Biorad/München) ermittelt.

### 2.2.5.2.5. Entfernung von primären Antikörpern (Stripping)

Um Membranen mehrfach mit Antikörpern behandeln zu können wurden die spezifischen Bindungen der Erstantikörper von bereits mit Antikörpern gefärbten Membranen entfernt werden. Hierzu wurde die Membran in Stripping-Puffer,

welcher 1:10 verdünnt wurde, eingelegt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker geschwenkt wurde. Danach erfolgte eine erneute Behandlung der Membran mit Blocking-Puffer, der 1:20 verdünnt wurde, für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss kann dann eine erneute Färbung der Membran mit neuen Antikörpern durchgeführt werden.

### 2.2.5.3 Nachweis der GFP Aktivierung mittels Immunhistologischer GFP Färbung

Bei den hier verwendeten Versuchstieren wird bei einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) ausgebildet. Um indirekt damit die NF- $\kappa$ B Aktivierung darzustellen wurde das eGFP mittels eines Antikörpers angefärbt.

#### 2.2.5.3.1 Durchführung der immunhistochemischen GFP Färbung

Für die GFP Färbung wurden Schnitte von 4-5  $\mu$ m Dicke verwendet. Die angefertigten Paraffinschnitte wurden mit dem anti-GFP Antikörper (1:400, 60 min, RT; Abcam, Cambridge, UK) inkubiert. Der sekundärer HRP-konjugierter anti-*rabbit* Antikörper (30 min, RT, Histofine; Nichirei, Tokyo, Japan) und Diaminobenzidin (Peroxidase EnVision Kit, DakoCytomation, Hamburg) wurden verwendet, um die spezifische Bindung darzustellen. Die Schnitte wurden mittels Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Nach Abschluss der Färbung werden die Gewebeschnitte „wässrig“ (Gelatine) eingedeckt und zum Trocknen verbracht.

#### 2.2.5.3.2 Auswertung der Färbung

Die Auswertung der GFP-gefärbten Lebergewebsschnitte erfolgt wieder durch zwei unabhängig voneinander bewertenden Personen doppelt-verblindet unter dem Lichtmikroskop. Ausgezählt werden dabei die positiven Ereignisse pro Blickfeld wobei bei allen Schnitten 25 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (500x) ausgewertet werden. Nicht-parenchymale Zellen wurden anhand der Morphologie und Lokalisation in den Leberazini identifiziert. Nach der Auszählung der positiven Ereignisse wird der Mittelwert der positiven Ereignisse errechnet. Der Mittelwert wird dann für die statistische Auswertung verwendet.

### 2.2.6 Die semi-quantitative *realtime*-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient der Quantifizierung der Genexpressionsveränderungen ausgewählter Gene. Hierfür kam der kommerziell erhältliche Primerassay wie unten beschrieben (SA-Biosciences (Superarray), Frederick, MD, USA) zum Einsatz. Zunächst wird die RNA aus dem Lebergewebe isoliert, anschließend erfolgte die Umschreibung der RNA mittels der reversen Transkriptase in die cDNA, welche dann als Ausgangsmaterial für die qRT-PCR verwendet wurde.

Das Lebergewebe wurde im Homogenisator (Precellys24, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) homogenisiert, und die RNA wurde anschließend mittels RNeasy-Systems (Qiagen, Hilden) extrahiert. Jeweils 350 µl RLT-Puffer (*RNA lysis tissue-buffer*; RNeasy Mini Kit) wurden pro Probe eingesetzt. Nach Gewebekomogenisierung wurden je 350 µl EtOH (70%) hinzugefügt, und die Lösung wurde auf die RNeasy-Säule übertragen. Im Anschluss an die Zentrifugation (10.000 rpm, 15 Sekunden) wurde das entstandene Eluat verworfen und 350 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert. Nach der zweiten Zentrifugation (10.000 rpm, 15 Sekunden) wurde das Eluat verworfen, und es wurden 80 µl DNase-Lösung nach Herstellerangaben auf die Membran der RNeasy-Säule pipettiert und es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden 350 µl RW1-Puffer hinzu pipettiert und erneut zentrifugiert. Die RNeasy-Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen übertragen, und nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer zentrifugiert. Anschließend wurden die RNeasy-Säulen erneut auf neue Sammelröhrchen übertragen, und die mRNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser nach Angaben des Herstellers eluiert. Der RNA-Gehalt der Proben wurde per NanoVue bestimmt und die Proben bei zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert oder direkt zur cDNA-Synthese verwendet.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe der RT-PCR und dem kommerziell erhältlichen AffinityScript PCR *cDNA Synthesis Kit* nach Anleitung des Herstellers (Qiagen). Im Anschluss erfolgte die Amplifizierung und die relative Quantifizierung der cDNA während der qRT-PCR im Thermocycler, wobei hierfür der RT2 SYBR Green/Rox Master Mix (SABiosciences) im Reaktionsvolumen von 25 µl verwendet wurde. Nach der Denaturierung bei 95°C für 10 min., folgten 40



## Material und Methoden

---

Zyklen mit 15 sec Denaturierung bei 95°C und 60 sec Annealing bei 60°C. Die Messungen erfolgen jeweils in der exponentiellen Phase der PCR-Zyklen. Als Referenzgen wurde die 18srRNA verwendet. Die untersuchten Gene sind in Tab. 14 aufgeführt. Durch die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der Signale erhöht. Die relative mRNA-Expression des Zielgens wurde mittels der vergleichenden Grenzwertzyklus (*threshold cycle, ct*)-Methode berechnet. Die relative Genexpression der Ziel-mRNA wurde durch Vergleich mit der Menge von 18srRNA erhalten.

**Tabelle 14: Verwendete Primer.**

Name	Refseq Accession-Nr.	UniGene No.
ICAM-1	NM_010493.2	Mm. 435508
MMP9	NM_013599.2	Mm.4406

### 2.2.7 Statistische Analyse

Statistische Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mittels ANOVA (*one-way analysis of variance*) und einem Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test für multiple Vergleiche erstellt. Die Berechnungen und die Erstellung der Graphen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

### 3. Ergebnisse

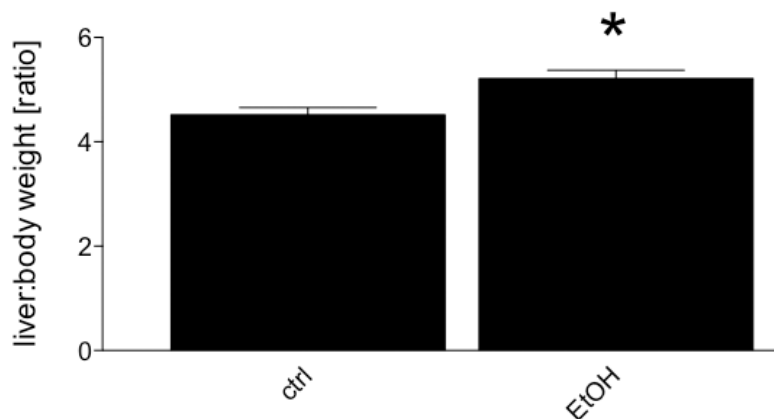
#### 3.1 Darstellung der pathologischen Veränderung durch chronische Ethanolfütterung

##### 3.1.1 *Liver to body weight* Ratio

Durch die chronische Ethanolfütterung (Gr.3/4/7/8) kommt es im Vergleich zu den kontrollgefütterten Tieren (Gr.1/2/5/6) zu einem signifikanten Anstieg der *Liver to body weight* Ratio (LBR).

**Tabelle 15: *Liver to body weight* Ratio.**

	EtOH	Kontrolle
LBR	5,212	4,518
SEM	0,1583	0,138

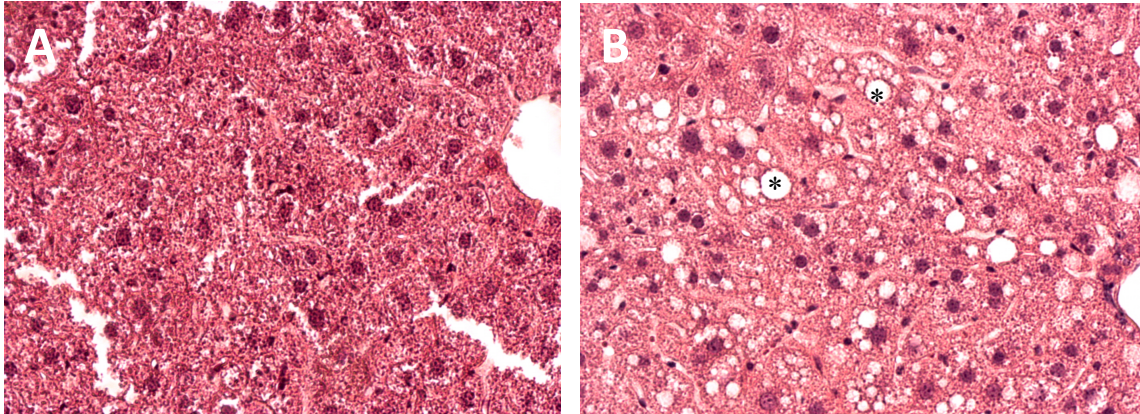


**Abbildung 1: Darstellung der *liver to body weight* Ratio** in Kontroll (ctrl)- und Lieber-DeCarli-gefütterten Alkoholtieren (EtOH). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben; \*:  $p < 0.05$ .

##### 3.1.2 Histopathologische Abbildung der ethanolinduzierten Fettleber

Durch die Fütterung mit ethanolhaltiger Flüssigdiät nach Lieber-DeCarli wird bei den Versuchstieren eine ethanolabhängige Leberverfettung induziert, die bereits in der HE abbildbar ist. Die ethanolgefütterten Tiere (Gruppe 3/4/7/8) zeigen eine

deutlich die Anzeichen einer Steatosis hepatis, gekennzeichnet durch die multiplen Vakuolen – das in den Vakuolen enthaltene Fett wird während des Färbeprozesses herausgelöst so dass die Vakuolen leer erscheinen (s. Abb 2).



**Abbildung 2: Repräsentative Darstellung der *Steatosis hepatis* durch Lieber-DeCarli Diät-Fütterung bzw. Kontrolldiät-Fütterung.** Bild A: Leber nach 4 Wochen Kontrolldiät-Fütterung – HE-Färbung; Bild B: Leber nach 4 Wochen Ethanol-Diät-Fütterung – HE-Färbung; 200x Vergrößerung. \* beispielsweise Markierung von Vakuolen.

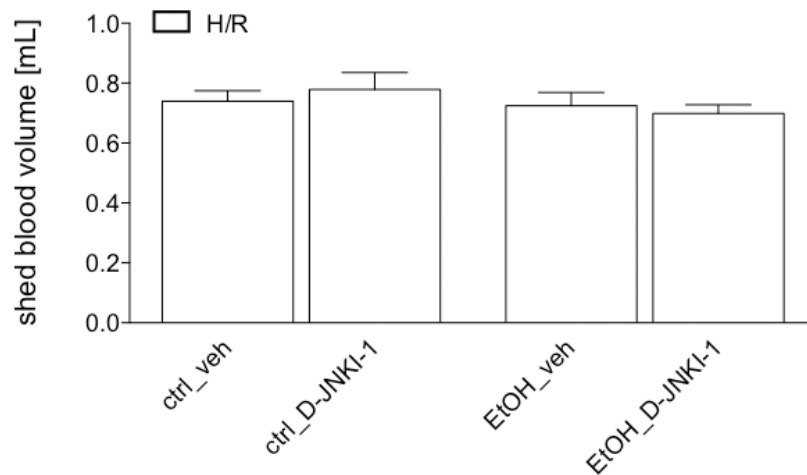
### 3.2 Darstellung des hämodynamischen Verlaufes während Hämorrhagie/Reperfusion bzw. Kontroll-Operation

#### 3.2.1. *Shed blood volume*

Um bei den Tieren der Hämorrhagie/Reperfusionen Gruppen (Gruppe 5/6/7/8) den hämorrhagischen Schock zu imitieren wird den Tieren über den einen Katheter Blut entnommen und der mittlere arterielle Druck so auf Werte < 40 mmHG mit dem Zielwert 32 mmHG abgesenkt. Die hierfür notwendigen maximalen Blutvolumina sind in der Tabelle 16 aufgeführt. Bei allen vier verglichenen Gruppen werden vergleichbare Blutvolumina benötigt um den mittleren arteriellen Druck entsprechend den Vorgaben abzusenken. Die Sham-operierten Tiere sind nicht aufgeführt, da kein Blut entnommen wurde.

**Tabelle 16: Entnommene Blutvolumina – *shed blood volume*.**

2h H/R	5 <i>ctrl</i> NaCl	6 <i>ctrl</i> DJNK	7 EtOH NaCl	8 EtOH DJNK
Shed blood volume [in ml] (MW/SEM)	<b>0,7396 / 0,035</b>	<b>0,7786 / 0,056</b>	<b>0,725 / 0,044</b>	<b>0,6992 / 0,029</b>



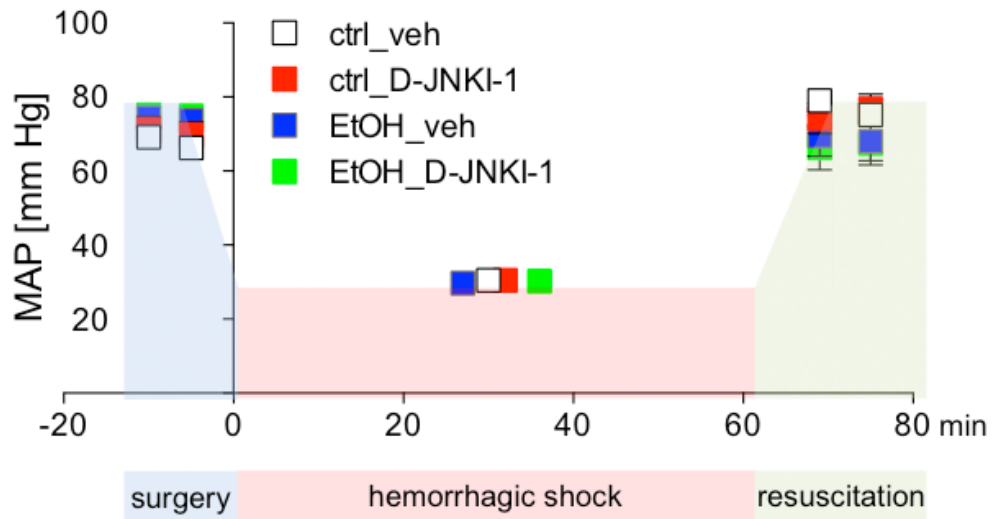
**Abbildung 3: Darstellung des entnommenen maximalen Blutvolumens für die Schockinduktion.** Kontroll (*ctrl*)- und Lieber-DeCarli-gefütterten Alkoholtieren (EtOH) sind dargestellt. Veh: keine Inhibitorgabe; D-JNKI-1: Inhibitorgabe. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

### 3.2.2 Mittlerer arterieller Druck

Die Blutdruckwerte vor während und nach Hämorrhagie/Reperfusion bzw. Sham-operation werden zwischen den einzelnen Gruppen verglichen, um eine Beeinflussung durch den chronisch ethyltoxischen Leberschaden zu demaskieren. Während der hypotensiven Phase werden alle Hämorrhagie/Reperfusionen-gruppen artifiziell auf dem gleichen MAP-Niveau gehalten. Bei den Tieren der Sham-Gruppen (Gruppe 1/2/3/4) zeigte sich eine stärkere Schwankung der MAP-Einzelwerte da hier der MAP-Wert nicht künstlich in einem bestimmten Bereich

## Ergebnisse

gehalten wurde, insgesamt ließ sich auch hier kein signifikanter Unterschied der MAP-Werte während der 90-minütigen sham-Phase verzeichnen.



**Abbildung 4: Darstellung der mittleren arteriellen Blutdruckwerte (MAP) vor H/R bzw. sham, in 5-minütigem Abstand während der 90 Minuten H/R bzw. sham-Phase und nach Reperfusion/Abschluss. Kontroll (ctrl)- und Lieber-DeCarli-gefütterten Alkoholtieren (EtOH) sind dargestellt. Veh: keine Inhibitorgabe; D-JNKI-1: Inhibitorgabe. sham und H/R gruppen wurde zusammengefasst.**

### 3.3 Organschädigung nach Hämorrhagie/Reperfusion bei chronisch ethanolgeschädigter Leber und die Beeinflussung durch D-JNK-1-Gabe

#### 3.3.1 Analyse der Marker für Zellschäden im Serum (AST / ALT und LDH)

H/R induziert eine signifikante Erhöhung der AST ( $1162.0 \pm 298.2$  IU/L) 2 h nach Reperfusion im Vergleich zu sham ( $162.5 \pm 15.2$  IU/L) oder vehicle-Gabe ( $p < 0.05$ , Abb. 5A). H/R-induzierte AST Freisetzung war durch die D-JNKI-1 Gabe signifikant reduziert (40%; Abb. 5A). In chronisch EtOH-gefütterten vehicle-behandelten Mäusen ist die H/R-induzierte AST-Freisetzung signifikant erhöht ( $2577.0 \pm 700.0$  IU/L) im Vergleich zu ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen ( $1162.0 \pm 298.2$  IU/L,  $p < 0.05$ , Abb. 5A). In EtOH-gefütterten D-JNKI-1-

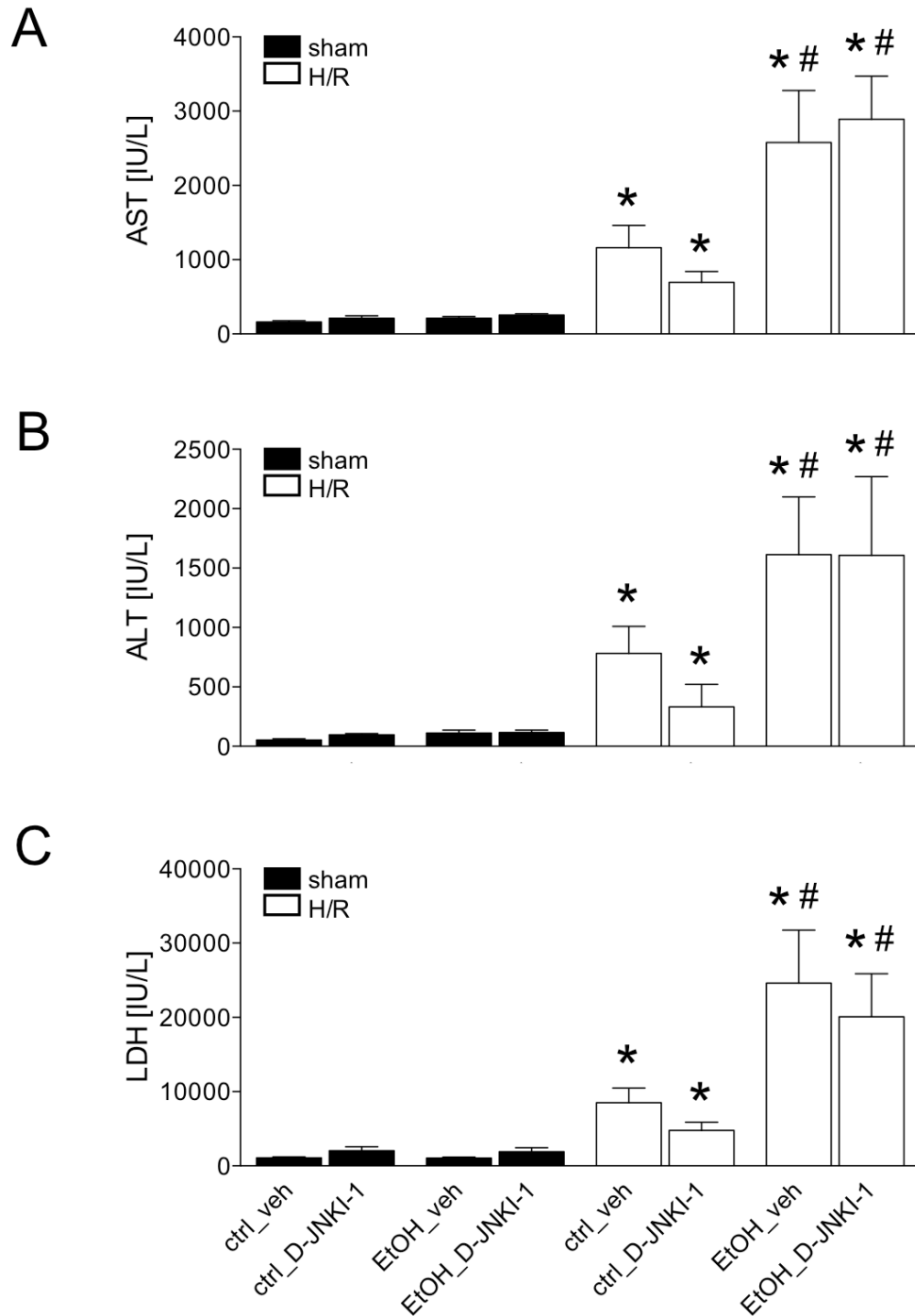
## Ergebnisse

---

behandelten Mäusen sind die AST Spiegel ( $2893.0 \pm 577.4$  IU/L) vergleichbar mit den AST Spiegel in EtOH-gefütterten vehicle-behandelten Mäusen (Abb. 5A).

H/R induziert eine signifikante Plasma ALT Erhöhung 2 h nach Reperfusion in ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen ( $781.9 \pm 228.5$  IU/L) im Vergleich zu sham ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen ( $50.0 \pm 11.2$ ,  $p < 0.05$ , Abb. 2B). H/R-induzierte ALT Freisetzung ist reduziert nach D-JNKI-1 Gabe (58%; Abb. 5B). EtOH erhöht signifikant die H/R-induzierte ALT-Freisetzung ( $1614.0 \pm 483.9$  IU/L,  $p < 0.05$ , Abb. 5B). EtOH-induzierte ALT Freisetzung nach H/R war nicht durch die D-JNKI-1 Behandlung verändert ( $1607.0 \pm 663.2$  IU/L).

LDH war 2 h nach Reperfusion signifikant erhöht in ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen im Vergleich zu sham ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen ( $p < 0.05$ , Abb. 5C). H/R-induzierte LDH-Erhöhung war nach D-JNKI-1 Gabe um 44% reduziert (Abb. 5C). In EtOH-gefütterten veh-behandelten Mäusen war die H/R-induzierte LDH-Erhöhung signifikant erhöht ( $24605.0 \pm 7161.0$  IU/L) im Vergleich zu ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen ( $8529.0 \pm 1968.0$  IU/L,  $p < 0.05$ , Abb. 5C). In EtOH-gefütterten D-JNKI-1-behandelten Mäusen waren die LDH Spiegel ( $20092.0 \pm 5783.0$  IU/L) statistisch vergleichbar mit EtOH-gefütterten veh-behandelten Mäusen (Abb. 5C).



**Abbildung 5: Abbildung der Serum-Enzymwerte A: AST. B: ALT. C: LDH; 2 h nach H/R (Hämorrhagie/Reperfusion) bzw. sham-Operation<sup>164</sup>, mit chronischer Ethanol-Fütterung (EtOH) bzw. Kontrolldiät-Fütterung (ctrl) veh: mit Lösungsmittelkontrolle NaCl (Vehikel) behandelte Tiere. D-JNKI-1: mit D-JNKI-1 behandelte Tiere (\*,  $p < 0.05$  vs. korrespondierende sham-Gruppe, #,  $p < 0.05$  vs. korrespondierende H/R Gruppe; Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.)**

### 3.3.2 Darstellung der histopathologischen Veränderungen in der HE - Färbung

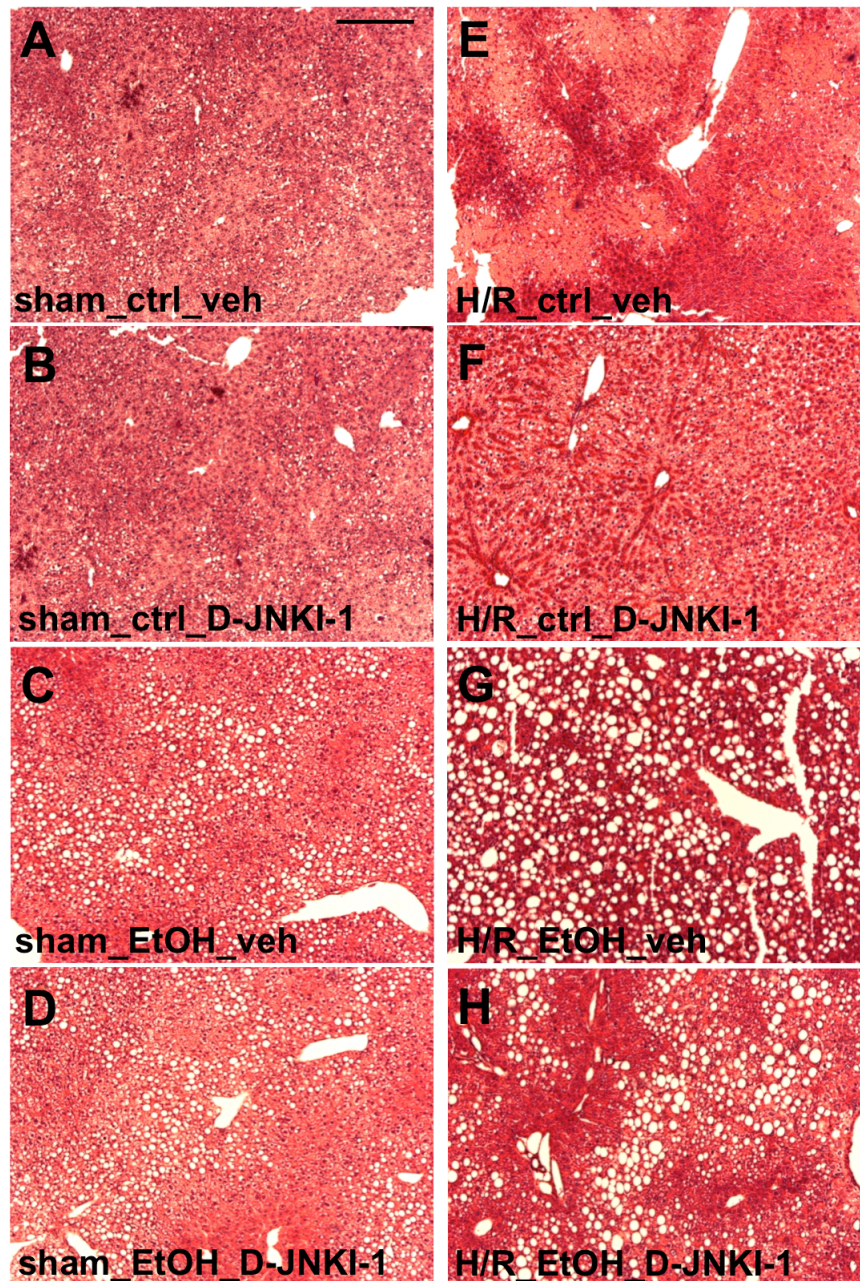
Bei den sham-Gruppen mit Kontrollfütterung mit D-JNK-1 und Vehikel (Gruppe 1/2) zeigt sich das Lebergewebe in der HE-Färbung strukturell homogen aufgebaut, ohne Zellschwellung oder Zellkernverlust und ohne wesentliche Verfettung (s. Abb 6).

Die sham-Gruppe mit chronischer Ethanolfütterung (Gruppe 3/4) zeigt im Vergleich häufiger eine beginnende Störung der Leberstruktur und Anzeichen der Leberverfettung ebenfalls unabhängig von der D-JNK-1 oder Vehikel-Gabe.

Die H/R-Gruppen sind im Vergleich zu Sham-operierten Gruppen durch teils sehr ausgedehnte Nekroseareale und eine Zerstörung der Leberstruktur gekennzeichnet (s. Abb. 6).

Die D-JNK-1 Applikation zeigt bei der H/R ctrl-Gruppe (Gruppe 6) zwar eine leicht jedoch nicht signifikante Minderung des Leberschadens (s. Abb.6). In der H/R EtOH-Gruppe (Gruppe 7/8) zeigt sich kein Unterschied durch D-JNK-1 Gabe (Gruppe 8) (s. Abb. 6), das Lebergewebe zeigt in diesen beiden Gruppen teils einen kompletten Strukturverlust mit maximalem Schaden.





**Abbildung 6: Repräsentative Darstellung des Ausmaßes der Organschädigung 2 h** nach sham-Operation mit Kontrolldiät-Fütterung (A+B), sham-Operation mit Ethanol-Diät-Fütterung (C+D), H/R mit Kontrolldiät-Fütterung (E+F), beziehungsweise H/R mit Ethanol-Diät-Fütterung (G+H) mittels HE-Färbung. veh: keine Inhibitorgabe; D-JNKI-1: Inhibitorgabe. (A: ctrl-gefütterte veh-behandelte Mäuse, B: ctrl-gefütterte D-JNKI-1-behandelte Mäuse, C: EtOH-gefütterte veh-behandelte Mäuse, D: EtOH-gefütterte D-JNKI-1-behandelte Mäuse nach sham; E: ctrl-gefütterte veh-behandelte Mäuse, F: ctrl-gefütterte D-JNKI-1-behandelte Mäuse, G: EtOH-gefütterte veh-behandelte Mäuse, H: EtOH-gefütterte D-JNKI-1-behandelte Mäuse nach H/R). Messbalken ist 200 µm lang.

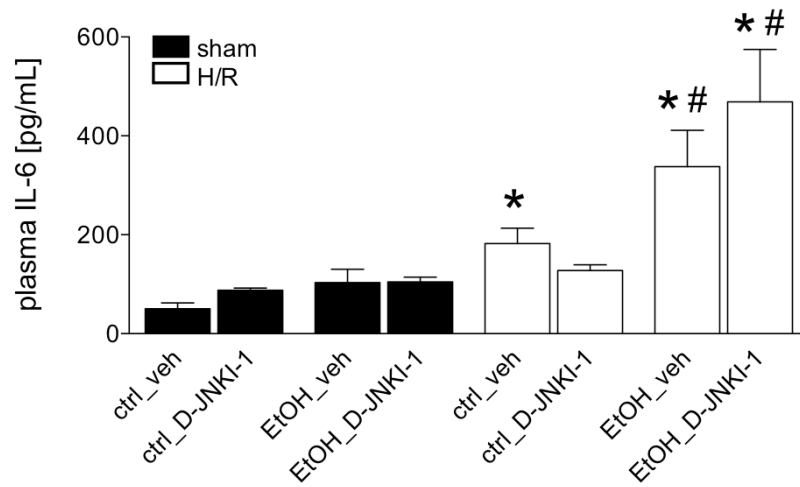
### 3.4 Untersuchung der systemischen und hepatischen Inflammationsreaktion

#### 3.4.1 Systemische pro-inflammatorische Veränderungen nach H/R am Beispiel von Interleukin (IL)-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$

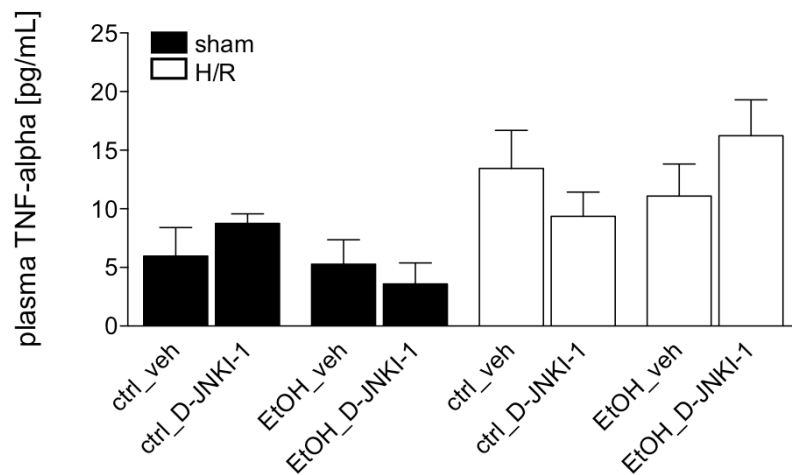
Zur Darstellung der systemischen Immunantwort in Folge der Reperfusion nach größerem Blutverlust sowie nach den entsprechenden Interventionen wurden die Serumwerte von IL-6 und TNF- $\alpha$  bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

H/R-induzierte systemische inflammatorische Antwort wurde 2 h nach Reperfusion durch signifikant erhöhte IL-6 Spiegel in der ctrl-gefütterten veh-behandelten Gruppe *versus* korrespondierende sham-Gruppe dargestellt ( $182.0 \pm 31.3$  vs.  $50.0 \pm 12.1$  pg/ml,  $p < 0.05$ , Abb. 7A). IL-6 Spiegel sind in D-JNKI-1-behandelten ctrl-gefütterten Mäusen im Vergleich zu korrespondierenden D-JNKI-1-behandelten sham-Gruppe nicht signifikant erhöht ( $127.8 \pm 11.3$  und  $87.7 \pm 4.6$  pg/ml, Abb. 7A). IL-6 ist in beiden sowohl EtOH-gefütterten veh- als auch D-JNKI-1-behandelten Mäusen im Vergleich zu H/R-induzierten IL-6 Erhöhung in den jeweils korrespondierenden Gruppen signifikant erhöht (EtOH\_veh:  $337.7 \pm 73.6$ , EtOH\_D-JNKI-1:  $466.6 \pm 106.3$  vs. ctrl\_veh:  $182.0 \pm 31.3$  und ctrl\_D-JNKI-1:  $127.8 \pm 11.3$  pg/ml,  $p < 0.05$ , Abb. 7A). Die TNF- $\alpha$  Spiegel zeigen zwar die ähnlichen Tendenzen, jedoch sind die Daten nicht signifikant (Abb. 7B).

A



B



**Abbildung 7: Plasma IL-6 (A) und TNF-alpha (B) Spiegel nach Hämorrhagie und Reperfusion (H/R) in paar-gefütterten Mäusen mit Ethanol- (EtOH) oder Kontrolldiät (ctrl). D-JNK1-1: Inhibitorgabe, veh: keine Inhibitorgabe. (\*:  $p < 0.05$  vs. korrespondierende sham-Gruppe, #:  $p < 0.05$  vs. korrespondierende H/R-Gruppe). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.**

### 3.4.2 Die lokale Immunreaktion – Analyse des hepatischen Interleukin-6

Zur Untersuchung der lokalen Immunreaktion bestimmten wird den Interleukin-6-Gehalt im hepatischen Gewebe mittels eines ELISA nach Proteinextraktion aus dem Lebergewebe. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied im IL-6-Gehalt zwischen den einzelnen Gruppen (Daten nicht dargestellt). Isoliert betrachtet, zeigte sich in der Kontrolldiät-gefütterten Gruppe ein diskreter aber nicht signifikanter Anstieg des hepatischen IL-6 nach H/R von 6170 vs. 5760 pg/ml/mg, auch konnten wir eine leichte Reduzierung des hepatischen IL-6 durch die Gabe von D-JNKI-1 in den Kontrolldiät-Gruppen sowohl bei den Tieren mit sham- als auch nach H/R nachweisen. Bei den Tieren der Ethanol-gefütterten Gruppen konnten wir keine relevante Beeinflussung durch D-JNK-1 feststellen. Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied der hepatischen IL-6 Werte im Vergleich der Kontrolldiät-gefütterten mit den ethanolgefütterten Tieren (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.3 Die lokale Immunreaktion – Analyse der hepatischen Genexpression

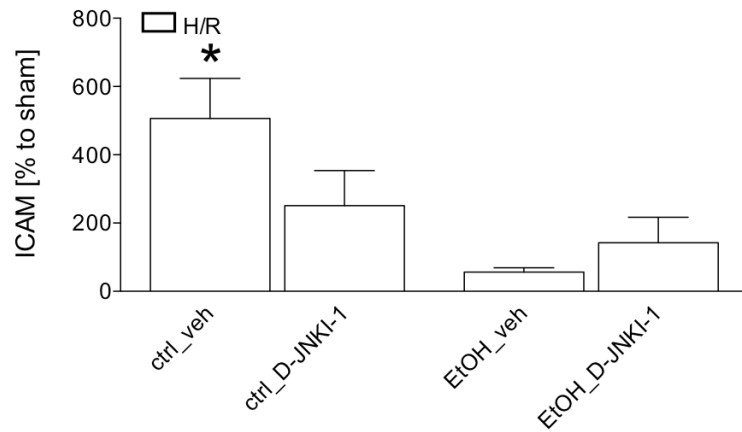
Die semi-quantitative qRT-PCR zeigt eine signifikante Erhöhung der ICAM-1 Genexpression 2 h nach Reperfusion in Leberproben von ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen im Vergleich zur korrespondierenden sham-Gruppe (506% vs. 100%,  $p < 0.05$ , Abb. 8A). Diese Erhöhung ist in D-JNKI-1-behandelten ctrl-gefütterten Mäusen nach H/R nicht zu beobachten (251%, Abb. 8A). EtOH-Fütterung reduziert tendenziell die ICAM-1 Genexpression nach H/R in beiden Gruppen, wobei die Spiegel dabei mit der sham-Gruppe vergleichbar sind (Abb. 8A).

MMP9 Genexpression ist in ctrl-gefütterten veh-behandelten Mäusen nach H/R versus sham Kontrolle signifikant erhöht (238% vs. 100%,  $p < 0.05$ , Abb. 8B). Dieser Anstieg in ctrl-gefütterten veh-behandelten Gruppe wird durch D-JNKI-1 in ctrl-gefütterten Mäusen signifikant reduziert (105%,  $p < 0.05$ , Abb. 8B). Vergleichbare Daten sind in EtOH-gefütterten Mäusen zu sehen. Eine starke

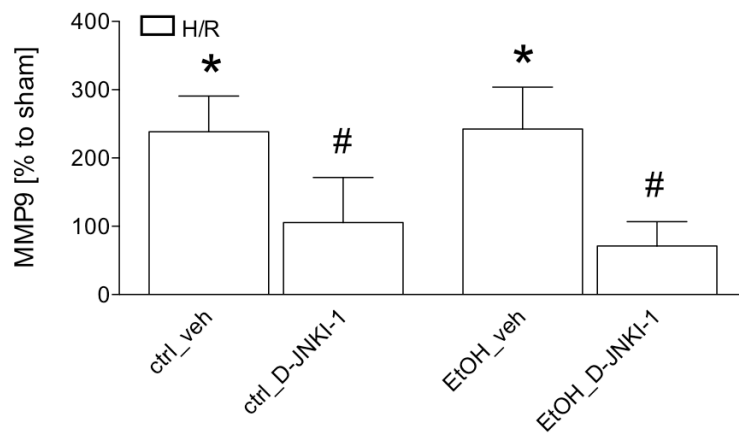
## Ergebnisse

Erhöhung in veh-behandelten Mäusen (243%) im Vergleich zur korrespondierenden sham Gruppe ist durch die D-JNKI-1 Gabe signifikant reduziert (71%,  $p < 0.05$ , Abb. 8B).

A



B



**Abbildung 8: Hepatische ICAM-1 (A) und MMP9 (B) Genexpression** 2 h nach Reperfusion in paar-gefütterten Mäusen mit Ethanol- (EtOH) oder Kontrolldiät (ctrl). D-JNKI-1: Inhibitorgabe, veh: keine Inhibitorgabe. (\*:  $p < 0.05$  vs. korrespondierende sham-Gruppe, #:  $p < 0.05$  vs. korrespondierende H/R-Gruppe). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

### 3.5 Nachweis der Transkriptionsfaktoren c-Jun und NF- $\kappa$ B bei chronisch ethanolgeschädigter Leber und die Beeinflussung durch D-JNK-1-Gabe

#### 3.5.1 Analyse von c-Jun und NF- $\kappa$ B (sowie pc-Jun und pNF- $\kappa$ B) im Western Blot

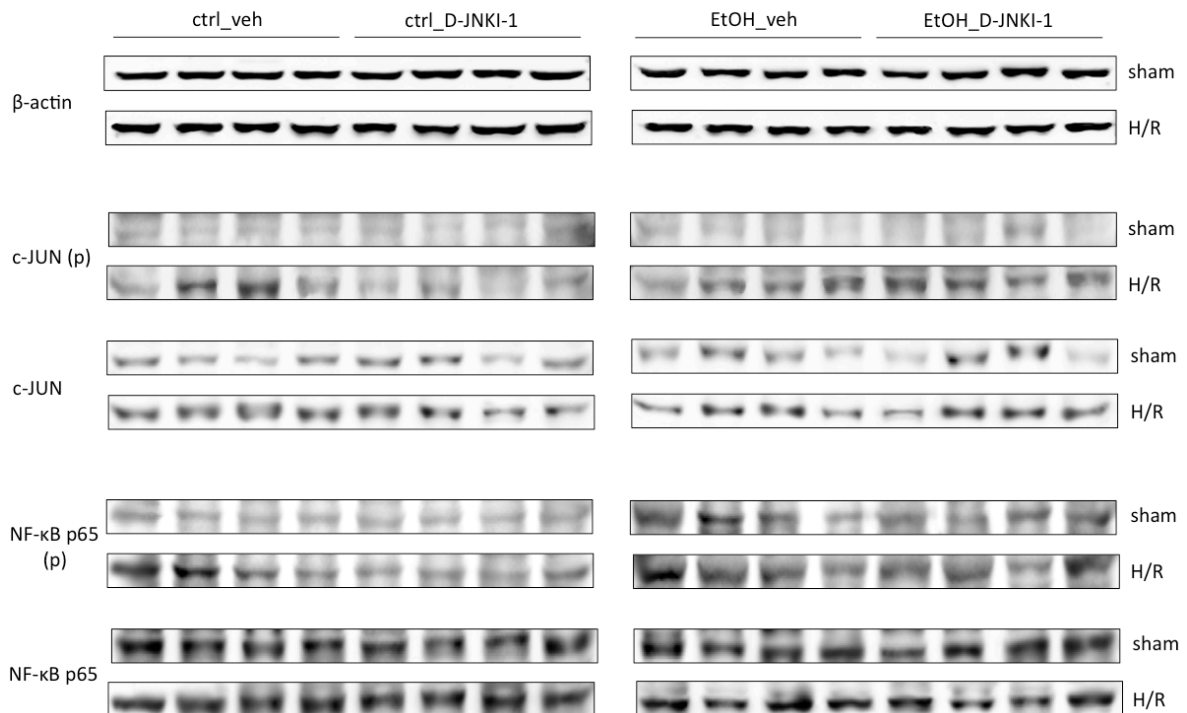
Für die Untersuchung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und c-Jun führten wir einen Western Blot durch. Dabei erfolgte der direkte Nachweis der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 bzw. c-Jun und der indirekte Beweis der c-Jun/NF- $\kappa$ B-Aktivierung über den Nachweis der phosphorylierten Proteinform von c-Jun (c-Jun) und p65 unter Verwendung spezifisch gerichteter Antikörper. Als *Housekeeping*-Protein diente  $\beta$ -Aktin. Die Proteinexpression des  $\beta$ -Aktins zeigt in allen Gruppen vergleichbar stark ausgeprägte Banden, was die Auftragung gleicher Proteinmengen bestätigt. c-Jun ist stark exprimiert nach H/R. Die chronisch EtOH-gefütterten Tiere zeigen hier nur minimal erhöhte c-Jun-Expression. D-JNK-1 führt in den sham-Gruppen nach Ethanol- oder Kontrollfütterung zu keiner relevanten Zu- oder Abnahme der c-Jun Proteinexpression, in der Kontrolldiät-gefütterten H/R-Gruppe zeigt sich leichte Abnahme von c-Jun und in der EtOH-gefütterten H/R-Gruppe kein Unterschied.

Untersucht man die phosphorylierte Form von c-Jun, so zeigt diese die gleichen Ergebnisse wie die Untersuchung von c-Jun, womit die Phosphorylierung von c-Jun vor allem durch das H/R, jedoch wesentlich geringer nur durch EtOH-fütterung gezeigt wird. D-JNK-1-Behandlung führt zu einer geringeren Phosphorylierung von c-Jun in der Kontrolldiät-gefütterten H/R-Gruppe jedoch nicht in der EtOH-gefütterten H/R-Gruppe.

Der Nachweis der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 zeigt in allen Gruppen eine ähnlich starke Proteinexpression. Betrachtet man die phosphorylierte Form p65, so zeigt sich eine zunehmende Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B bei chronischer EtOH-Fütterung sowie in der H/R-Gruppe. Die D-JNK-1-Gabe nach H/R in der Kontrolldiät-gefütterten Gruppe reduziert die NF- $\kappa$ B Phosphorylierung. Bei der ethanolgefütterten H/R-Gruppe zeigt sich durch die D-JNK-1-Gabe keine

## Ergebnisse

Veränderung in der Proteinexpression der phosphorylierten NF- $\kappa$ B p65 Einheit (Abb. 9).



**Abbildung 9: Darstellung von c-JUN, NF- $\kappa$ B p65 und  $\beta$ -actin mittels Western Blot.** 2 Stunden nach Reperfusion wurden Proteine aus dem Lebergewebe isoliert und ein Western Blot durchgeführt. Es wurde die phosphorylierte oder nicht-phosphorylierte Form des c-JUN, der p65 *subunit* des NF- $\kappa$ B und  $\beta$ -Aktin dargestellt. Die Mäuse wurden paar-gefüttert mit Ethanol- (EtOH) oder Kontrolldiät (ctrl). D-JNKI-1: Inhibitorgabe, veh: keine Inhibitorgabe.

### 3.5.2 Darstellung der NF- $\kappa$ B Aktivierung durch GFP-Immunhistologie

Bei den Sham Gruppen mit Kontrollfütterung mit D-JNK-1 und Vehikel zeigt sich kein wesentlicher Nachweis von GFP-positiven Ereignissen (Daten nicht gezeigt). Die Sham-Gruppe mit chronischer Ethanolfütterung zeigt ebenfalls unabhängig von der D-JNK-1 Gabe wenig GFP-positive Ereignisse.

Die H/R-Gruppe ist, wie in der HE-Färbung bereits dargestellt wurde, durch teils sehr ausgedehnte Nekroseareale und eine Zerstörung der Leberstruktur gekennzeichnet in welcher auch keine GFP-positiven Ereignisse vorliegen können, da in diesen Arealen keine Syntheseleistung mehr stattfinden. In dem verbleibenden Lebergewebe zeigen sich im Vergleich mit den sham-operierten Tieren relativ viel häufiger GFP-positive Ereignisse. Die D-JNK-1-Applikation zeigt bei der H/R ctrl-

## **Ergebnisse**

---

Gruppe zwar eine leichte jedoch nicht signifikante Minderung der GFP-Signale (Daten nicht gezeigt). In der H/R EtOH-Gruppe zeigt sich kein Unterschied durch D-JNK-1-Gabe (Daten nicht gezeigt), das Lebergewebe zeigt hier teils einen kompletten Strukturverlust mit maximalem Schaden.



### 4. Diskussion

#### 4.1 Auswirkungen von chronischer Alkoholfütterung und Hämorrhagie- und Reperfusionstrauma auf die Leber

Durch die Fütterung mit einer ethanolhaltigen Flüssigdiät nach Lieber-DeCarli entstehen bei den Versuchstieren Veränderungen des Lebergewebes im Sinne einer chronisch alkoholtoxischen Leberschädigung, wie sie durch chronischen Alkoholabusus beim Menschen entstehen. Die *Liver to body weight* Ratio zeigte hier in der Gruppe der Ethanol-gefütterten Mäuse einen Anstieg im Vergleich zu den mit isokalorischer Kontrolldiät gefütterten Mäusen, was die durch Ethanol ausgelöste Zunahme des Leber Volumens, eine Hepatomegalie, widerspiegelt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den zahlreichen Untersuchungen anderer Forschungsgruppen, die mit Flüssigdiät nach Lieber DeCarli arbeiten<sup>165,166</sup>.

In den Gruppen der ethanolgefütterten Tiere kam es nach der 4-wöchigen Fütterung zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten, Erhöhung der Transaminasen (AST/ALT), die für eine Schädigung der Hepatozyten steht. Die histologische Untersuchung des Lebergewebes durch HE-Färbung bildet ebenfalls die beginnende Schädigung des Lebergewebes durch die ethanolhaltige Fütterung ab. Ziel der Fütterung in unserem Versuch war die Induktion einer ethanolbedingten Leberschädigung im Sinne einer alkoholtoxischen Lebererkrankung Stadium 1 (*Steatosis hepatis*), da die Inflammationsreaktion in dieser Arbeit hauptsächlich durch das Hämorrhagie/ Reperfusionstrauma und nicht schon bereits durch eine Steatohepatitis ausgelöst werden sollte.

Wie bereits beschrieben können bei der alkoholtoxischen Lebererkrankung die 3 Stadien Steatosis, Steatohepatitis, Fibrose/Zirrhose parallel im Organ vorliegen. In unseren Untersuchungen spiegelt die Erhöhung der *Liver body weight* Ratio, die leichte Erhöhung der Transaminasen sowie das histologische Bild wider, dass es bei den Versuchstieren mehrheitlich zur Ausprägung einer alkoholbedingten *Steatosis hepatis* = Stadium 1 gekommen ist. Die Hepatomegalie, welche durch die *Liver to body weight* Ratio gezeigt wird, ist Ausdruck der Volumenzunahme der Leber durch eine Verfettung im Rahmen einer *Steatosis hepatis*. Der teils nur leichte Anstieg der Transaminasen bei den Ethanol-gefütterten Tieren in der

## Diskussion

---

Versuchstiergruppe in der Sham-Gruppe ohne Hämorrhagie-/Reperfusionstrauma entspricht Untersuchungen, dass ein alkohol-toxischer Leberschaden im Stadium 1, sogar auch im Stadium der Leberzirrhose, nicht zwingend mit einer massiven Erhöhung der Transaminasen verbunden sein muss.

Histologisch zeigte sich bei den Tieren durch die ethanolhaltige Fütterung bereits in der HE-Färbung eine Zunahme der Anzahl fetthaltiger Vakuolen sowie Schädigung der Leberstruktur. Durch die in zahlreichen Studien etablierte ethanolhaltige Lieber-DeCarli Diät kommt es zur Entwicklung einer rein alkoholbedingten Steatosis hepatis und Steatohepatitis<sup>167</sup>, was wir auch in eigenen vorausgegangenen Studien an Mäusen histologisch nachweisen konnten<sup>168</sup>. Zusammenfassen ist also basierend auf den Ergebnissen unser Modell zur Untersuchung der aufgeführten Fragestellung geeignet.

Durch die H/R-Prozedur wird ein deutlicher Anstieg der Werte der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase und der Laktatdehydrogenase, als Hinweis für Zell- und Lebergewebeschäden, im Vergleich zu den sham-operierten Gruppen ausgelöst<sup>169,170</sup>. Dieser Effekt zeigt sich sowohl bei den Ethanol-gefütterten als auch bei den Kontrolldiät-gefütterten Gruppen. Natürlich wird durch den 90-minütigen hämorrhagischen Schock, die nachfolgende Reperfusion und die daraus resultierende posttraumatische Inflammationsreaktion nicht nur das Lebergewebe, sondern auch der gesamte Organismus beeinträchtigt. Als laborchemischer Marker für Zellschäden zeigt die Laktatdehydrogenase in der H/R-Gruppe eine deutliche Erhöhung gegenüber den Werten in den Kontrollgruppen, welche durch die Gewebeischämie während der Schockphase aufgrund der Minderperfusion bedingt ist.

Die Leberstruktur wird durch die in vielen Tiermodell-Studien standardisiert durchgeführter H/R-Prozedur deutlich geschädigt<sup>171</sup>. Histologisch zeigen sich in der HE-Färbung der Leber nekrotische Areale sowie Vakuolenbildung in den Zellen<sup>172</sup>.

Vergleicht man die Tiere mit durch ethanolhaltiger Diät ausgelöster Leberschädigung mit den Tieren, welche eine ethanolfreie isokalorische Kontrolldiät erhalten haben, nach H/R-Intervention, so sind Transaminasen in der

Ethanolgruppe nochmals deutlich erhöht. Gleiches trifft für die Werte der Laktadehydrogenase zu. Durch pathologische Mechanismen, die durch einen vorbestehenden Leberschaden hervorgerufen wurden (veränderter sinusoidaler Raum, verminderter mikrozirkulatorischer Blutfluss, mitochondriale Schäden, Rekrutierung von Immunzellen) nimmt die Komplexität der Leberschädigung nach Ischämie/Reperfusion nochmals zu<sup>173,174</sup>. Han *et al.* (2001) haben in ihren Untersuchungen gezeigt, dass es nach chronischer Alkoholfütterung in Kombination mit Ischämie zu einer gesteigerten Produktion von freien Sauerstoff-Radikalen und verminderter Gluthation-Synthese kommt. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass es bei alkoholgefütterten Ratten durch Ischämie-/Reperfusionstrauma zeitabhängig zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten, Albuminverlust und verminderter Strömungsgeschwindigkeit von roten Blutzellen, verglichen mit nicht lebergeschädigten Ratten kommt<sup>175</sup>. Histologisch zeigen mit ethanolhaltiger Diät gefütterte Ratten nach Hämorrhagie Reperfusionstrauma doppelt so viele Nekroseareale wie nach Kontrollfütterung. Dies geht einher mit einer erhöhten Akkumulation von Neutrophilen<sup>176</sup>.

### 4.2 Inflammationsreaktion nach Hämorrhagie-/ Reperfusionstrauma und durch chronische Ethanolaufnahme ausgelöster Leberschaden

In der Studie von Da Silva *et al.* zeigt sich durch eine chronische Alkoholfütterung eine deutliche Erhöhung des proinflammatorischen TNF- $\alpha$ <sup>177</sup>, auch in der Studie von McClain *et al.* wird belegt, dass bei alkoholgeschädigter Leber oder Leberzirrhose meist erhöhte Endotoxin Spiegel vorliegen, die einen starken Stimulus für die TNF- $\alpha$ -Produktion darstellen, und dass die Häufigkeit und die Quantität der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus peripheren Monozyten vermehrt ist<sup>178</sup>. Bereits Lieber und DeCarli haben beschrieben, dass es durch die orale chronische Alkoholfütterung zur vermehrten Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF-alpha, IL-1beta kommt<sup>179</sup>. Ein weiteres Zytokin, das eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen nach H/R aber auch durch chronische Alkoholfütterung spielt, ist das IL-6<sup>180</sup>.

Die Rolle von IL-6 bei der Entwicklung eines chronisch alkoholbedingten Leberschadens ist komplex. IL-6 wird unter anderem alkoholbedingt durch LPS-angeregte Kupffer-Zellen ausgeschüttet und trägt zur Unterhaltung der Leberschädigung bei<sup>181,182</sup>. Es scheint jedoch auch hepatoprotektives Potenzial zu besitzen. So zeigen Untersuchungen von Hong *et al.* dass die Applikation von IL-6 bei Mäusen mit alkoholinduziertem Leberschaden (8-Wochen ethanolhaltige Fütterung) eine relevante Verringerung der Steatosis (nachgewiesen *via* Red-oil-O Färbung und Messung hepatischer Triglyceride) zeigt<sup>182,183</sup>. Des Weiteren konnten Hong *et al.* Nachweisen, dass bei IL-6 defizienten Mäusen (IL-6<sup>(-/-)</sup>) im Vergleich zu IL-6 kompetenten Mäusen (IL-6<sup>(+/+)</sup>) bei 8-wöchiger chronischer Alkoholfütterung deutlich mehr apoptotische Zellen auftreten, und dieser Effekt durch die Gabe von IL-6 abgeschwächt werden kann<sup>184</sup>.

Das Ergebnis des erhöhten Serum-IL-6 Wertes nach 4-wöchiger ethanolhaltiger Fütterung in dem vorliegenden Versuch deckt sich mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien<sup>183,184</sup>, jedoch gibt der gleichbleibende Wert des hepatischen IL-6 mit oder ohne ethanolhaltige Fütterung Anlass zur Diskussion, würde man doch von einem ebenfalls erhöhten Wert ausgehen. Eine Ursache könnte die hier angewendete 4-wöchige Dauer der Fütterungsperiode sein. So zeigten Kamimura und Tsukamoto 2005 an isolierten Kupffer-Zellen von Ratten zwar deutlich erhöhte IL-6 mRNA-Werte nach 17-wöchiger ethanolhaltiger Fütterung, die Werte nach nur 10 Wochen waren jedoch nur minimal erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe<sup>185</sup>.

Die Auslösung einer posttraumatischen inflammatorischen Reaktion nach Polytraumata und auch im spezifischeren Fall des hämorrhagischen Schocks ist durch multiple Studien bereits belegt. Die Plasmaspiegel der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 sind in den ersten Stunden nach dem auslösenden Trauma erhöht, für IL-6 konnte in neueren Studien sogar belegt werden, dass der IL-6-Anstieg mit der Verletzungsschwere korreliert<sup>186,187</sup>. Unsere Daten belegen ebenfalls diese inflammatorische Antwort.

Auch während der H/R nachfolgenden Inflammationsreaktion zeigt sich die komplexe Rolle von IL-6. Studien mit IL-6-defizienten Mäusen zeigen beispielsweise, dass die PMN Infiltration von Lunge und Leber nach Hämorrhagie/Reperfusionstrauma bei diesen Mäusen gegenüber Wildtyp-

Mäusen deutlich vermindert ist, und auch die Anzahl fokaler Nekroseareale in der Leber als Folge eines u.a. inflammatorisch verursachten Leberschadens sind gegenüber IL-6 kompetenten Mäusen signifikant reduziert<sup>188</sup>.

### 4.3. Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κB

In der vorliegenden Untersuchung konnten wir indirekt eine Aktivierung von NF-κB mittels Nachweis von phosphoryliertem p65 sowohl durch die chronische Ethanol-Fütterung als auch durch die H/R-Prozedur nachweisen. In der histologischen Untersuchung zeigte sich durch die H/R-Prozedur ebenfalls eine Zunahme von GFP-positiven Zellen als Nachweis einer NF-κB Aktivierung. NF-κB wird durch Zytokine wie IL-1β oder TNF-α aktiviert<sup>139</sup>. IL-1β und TNF-α fördern die Phosphorylierung, und Abbau von IκB -proteinen was zu einer Translokation von NF-κB in den Zellkern führt, wodurch es dann zu einer Transkription von NF-κB-abhängigen Zielgenen kommt, z.B. COX-2, MMP9 oder iNOS. Diese Zielgene aktivieren wiederum Immunzellen, und induzieren somit die entstehende Inflammationsreaktion<sup>177,189</sup>. Neben anderen Zielgenen wird auch die Transkription von IL-6 durch NF-κB hochreguliert<sup>190</sup>. IL-6 scheint jedoch auch umgekehrt Einfluss auf die Aktivierung von NF-κB bei H/R-Trauma zu haben. So zeigt die Studie von Zhi Hong Meng *et al.*, dass NF-κB bei IL-6-defizienten Mäusen im Vergleich zur sham-Gruppe nach H/R nicht erhöht ist, während es bei IL-6 kompetenten Wildtypmäusen deutlich erhöht ist<sup>188</sup>.

Untersuchungen an chronisch alkoholgefütterten Ratten zur Beeinflussung des Leberschadens durch eine Hemmung von NF-κB wurden von Uesagi *et al.* durchgeführt. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass eine Hemmung von NF-κB durch einen IκB-Superrepressor (AdIκB-SR – *recombinant replication-deficient adenoviral IκB superrepressor*) zu einer deutlichen Reduzierung des ethyltoxisch bedingten Leberschadens führt. Durch chronische Ethanolzufuhr kommt es zu einer vermehrten Aktivierung von Kupffer-Zellen, unter anderem durch die Vermehrung von LPS im portalen Blut, welche über die Aktivierung von NF-κB vermehrt TNF-α ausschütten, und damit Leberschäden und eine Inflammationsreaktion triggern. Sie begründeten die Abschwächung des Leberschadens vor allem durch die

Hemmung von NF- $\kappa$ B in Kupffer-Zellen<sup>165</sup>. Die Gabe von DEC-Diethylcarbamazepin, in der Studie von da Silva *et al.*, konnte ebenfalls die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und somit die Aktivierung der NF- $\kappa$ B abhängigen Zielgene (COX-2, iNOS, IL-1 $\beta$ ) reduzieren, und den durch chronische Alkoholfütterung verursachten Leberschaden deutlich abschwächen<sup>177</sup>.

In der Studie von Masafumi *et al.* zum Einfluss von NF- $\kappa$ B im Zusammenhang mit H/R-Trauma und chronischer Alkoholfütterung an Ratten konnte eine deutliche Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch H/R in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der Kontrolldiät-Gruppe zeigte die Gruppe mit Lieber-DeCarli Diät-Fütterung (10 Wochen) nochmals eine Steigerung der NF- $\kappa$ B Aktivierung. Auch zeigte sich dementsprechend eine Aggravation der untersuchten Leberschäden. Masafumi *et al* schlussfolgerten, dass es bei H/R-Trauma zu einer durch NF- $\kappa$ B vermittelt gesteigerten IL-6 und G-CSF Entstehung kommt, was zu einer gesteigerten Neutrophileninfiltration des Lebergewebes führt, und die durch vorausgehenden chronischen Ethanol-konsum noch deutlich gesteigert wird<sup>176</sup>. Diese Ergebnisse unterstreichen die Schlüsselrolle die der Aktivierung von NF- $\kappa$ B im Rahmen der Entstehung und Aufrechterhaltung der Inflammationsreaktion zufällt.

#### 4.4. Die Rolle von c-Jun

c-Jun kann, vermittelt über die MAPK-Kaskade und JNK, von einer Vielzahl von Stimuli aus der Umwelt, oxidativem Stress sowie von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und Wachstumsfaktoren aktiviert werden<sup>148,191,192</sup>. Diese Aktivierung resultiert in der Bildung von AP-1 und damit in der vermehrten Transkription seiner Zielgene<sup>148</sup>.

Dass JNK und demzufolge c-Jun/AP-1 in hohem Ausmaß für Entstehung des hepatischen Schadens nach partieller Ischämie/Reperfusion in Kombination mit Hepatektomie mitverantwortlich ist, konnten Uehara *et al.* in ihrer Arbeit „*JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury*“ aufzeigen. Durch die Inhibition von JNK, mittels hochspezifischer ATP-kompetitiver JNK-Hemmer (CC0209766, CC0223105, CC-401) konnten sie die Phosphorylierung von c-Jun und die Aktivierung von AP-1 zeitabhängig deutlich verzögern und quantitativ vermindern,

was eine signifikante Steigerung der Überlebensrate und eine signifikante Minderung der Nekrose- und Apoptoserate, der Lipid-Peroxidation und des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  erzielte<sup>157</sup>. In eigenen Studien konnten auch wir bereits zeigen, dass c-Jun deutlich erhöht ist nach H/R und c-Jun Inhibierung mit antiinflammatorischen Effekten nach H/R und geringerem Ausmaß der Leberschädigung assoziiert ist<sup>156,158</sup>. Die Daten der vorliegenden Studie bestätigen dies ebenfalls. Eine Hemmung der JNK / c-Jun / AP-1 Kaskade erscheint daher als ein vielversprechender Ansatz für die Modulation der Folgen von Ischämie/Hämorrhagie- und Reperfusion, wie dies auch in vorausgehenden Arbeiten an Ratten bereits gezeigt wurde<sup>158</sup>.

### 4.5 Die Gabe von D-JNK-1 vermindert den Zell- und Leberschaden sowie die Zytokinfreisetzung nach Hämorrhagie/Reperfusion

Studien aus unserer eigenen Arbeitsgruppe haben zuvor an Ratten bereits gezeigt, dass die selektive Hemmung von c-Jun die oxidative Stressreaktion in der Leber vermindert, die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten reduziert, die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zelluntergänge senkt und die hepatischen und systemischen Zytokinspiegel herabsetzt<sup>158</sup>. Wir konnten diesen Effekt ebenfalls an in dem hier vorliegenden Modell mit den cis-trans-eGFP-Mäusen nachweisen. Für die Untersuchung der Rolle der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK's) verwendeten wir ein spezifisch gegen JNK ausgerichtetes Inhibitorpeptid (D-JNK-1), welches uns im Rahmen eines durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projektes (Projekt-Nr.: MA 1119/3-3) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Tiziana Borsello zur Verfügung stand. D-JNK-1 gehört zu der Gruppe der zellpenetrierenden Peptide (CPP – *cell permeable peptides*)[45], welche Zellmembranen passieren können und auch als Träger für andere Fusionsproteine, Nukleinsäuren oder Nanopartikel fungieren können. JNK-hemmende Peptide werden durch die Bindung von der 10-Amino-HIV Tat(48-57) Transporter Sequenz an die 20-Aminosäure JNK-bindungsstelle (JBD20) des JNK-interacting Protein-1/islet-brain-1 (JIP-1/IB1) gebildet. Wir verwendeten für die Versuche die „all-D-retroinverso-Form“ (D-JNKI-1) die im

## Diskussion

---

Vergleich zur L-Form (L-JNK-1) proteaseresistent ist und eine verlängerte Halbwertszeit *in vivo* aufweist[46]. Borsello *et al.* konnten u.a. nachweisen, dass die intracerebrale Applikation von D-JNK-1 bei Ratten die Aktivierung von c-Jun und das Infarktareal signifikant vermindert sowie das Überleben bei cerebraler Ischämie signifikant erhöht<sup>159</sup>. Ebenso konnten wir in unseren Untersuchungen zeigen, dass die Applikation von D-JNK-1 nach ischämischen Geschehen eine verminderte Aktivierung von c-Jun, einen verminderten Anstieg von AST, ALT und LDH sowie eine Reduzierung der inflammatorischen Reaktion und des hepatischen Schadens im Vergleich zu den Kontrollgruppen bewirkt.

Hämorrhagisches Schockgeschehen löst eine Zunahme der TNF- $\alpha$  und IL-6 Produktion in Kupffer-Zellen aus. Die Studie von Thobe *et al.* konnte zeigen, dass die Hemmung der MAP-Kinase-Kaskade und JNK zu einer deutlichen Reduktion der TNF- $\alpha$  und IL-6 Produktion in Kupffer-Zellen führt<sup>78</sup>. Viele Arbeitsgruppen konnten eine Verminderung der inflammatorischen Antwort nach Hämorrhagie durch Applikation verschiedener Wirkstoffe wie z. B. Pflanzenbestandteile (Dioscin<sup>193</sup>, *green tea*<sup>194</sup>, Hinokitiol<sup>195</sup>) Medikamente (Simvastin<sup>169</sup>), erreichen. Tao *et al.* konnten nach der Gabe von Dioscin eine Reduzierung der mRNA-Level von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  MIP-1 $\alpha$  MIP-2 und ICAM-1 sowie eine verminderte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 nachweisen. Des Weiteren auch, dass ihre Behandlung zu einer geringeren Expression von phosphoryliertem p38, JNK und ERK führte<sup>193</sup>. Diese Untersuchungen unterstreichen unsere Hypothese, dass die inflammatorische Antwort über die MAPK-Kinase-Kaskade in relevantem Maße mitreguliert wird. So zeigte sich im Western Blot, dass die Gabe von D-JNKI-1 nicht nur in einer Abnahme von phosphorylierten c-Jun nach H/R-Prozedur sondern auch in einer Abnahme des phosphorylierten NF- $\kappa$ B Bestandteils p65 resultierte. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Signalwege der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und c-Jun sich auch gegenseitig beeinflussen.



### 4.6 Die Gabe von D-JNK-1 führt zu keiner signifikanten Verbesserung nach Hämorrhagie / Reperfusion bei Vorliegen eines durch chronische ethanolhaltige Fütterung ausgelösten Leberschadens

Die Hämorrhagie/Reperfusionprozedur löst bei Versuchstieren nach chronischer ethanolhaltiger Fütterung einen massiven Anstieg der Transaminasen und der LDH, sowie einen histologisch nachgewiesenen Schaden der Leberstruktur aus. Im Vergleich mit den Kontrolldiät-gefütterten Tieren können diese Auswirkungen nicht durch die Gabe von D-JNK-1 vermindert werden. Auch IL-6 und TNF- $\alpha$  als Marker einer inflammatorischen Antwort zeigen erhöhte Serumspiegel, welche nicht durch D-JNK-1-Gabe beeinflusst werden können. Hierzu passend wiederholt sich auch in der Western Blot Analyse durch die D-JNK-1 Gabe keine relevante Reduzierung von phosphorylierten c-Jun und p65 erzielt werden kann. Die Wirksamkeit des Inhibitors wie in vorherigen und o.g. Studien an H/R gezeigt, konnte zwar bestätigt werden, jedoch blieb der erwünschte Effekt aus. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass die Gabe von D-JNK-1 nach Hämorrhagie vor der Reperfusion bei Vorliegen einer chronisch ethyltoxischen Lebererkrankung aufgrund des vorliegenden strukturellen und funktionellen Schadens keine ausreichenden protektiven Effekte induzieren kann, welche D-JNK-1 durch eine Abschwächung des Leberschadens und der Inflammationsreaktion herbeiführen könnte. Natürlich ist auch zu diskutieren, ob sich durch eine mehrfache oder wiederholte Gabe, eine Erhöhung der Dosis oder Wahl des Zeitpunkts der D-JNK-1 Applikation die Effekte in dem vorliegenden Modell benefiziell entwickeln können.

### 4.7 Schlussfolgerung

Das Vorliegen eines ethyltoxischen Leberschadens in diesem Modell ist mit einer deutlichen Aggravation des posthämorrhagischen Leber- und Gewebes Schadens und der Inflammationsreaktion vergesellschaftet. Hämorrhagie und Reperfusion verursachen ebenso wie chronische Ethanol fütterung eine erhöhte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, welche durch die Gabe von D-JNK-1 vor der Reperfusion moduliert werden kann, wie das bereits in vorausgehenden Studien an Ratten nachgewiesen werden konnte.

Dieser Punkt belegt erneut, dass D-JNK-1 Gabe durch die Modulation von c-Jun N-terminalen Kinasen die reaktiven inflammatorischen Prozesse nach H/R-Trauma leberprotektiv beeinflussen kann<sup>158</sup>. Bei Vorliegen einer ethanolvorgeschädigten Leber ist die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Vergleich zu lebergesunden Tieren erhöht, jedoch kann hier die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine durch D-JNK-1-Gabe nicht signifikant beeinflusst werden. Die Ursache hierfür könnte in der verminderten Hemmung von c-Jun und NF- $\kappa$ B durch D-JNK-1 bei Vorliegen einer chronisch ethyltoxisch-geschädigten Leber liegen, und sich die ethanolbedingten und posttraumatischen Schäden ungehindert miteinander potenzieren können.

### 5. Zusammenfassung

Ein durch einen chronischen Ethanolabusus vorgeschädigter Organismus erfährt nach Hämorrhagie/Reperfusion (H/R) Trauma eine vermehrte inflammatorische Antwort und höheres Ausmaß an hepatischer Schädigung. Dies ist mit häufigerem Auftreten von Komplikationen und verlängertem Intensivaufenthalt vergesellschaftet.

Andere sowie eigene Studien haben gezeigt, dass durch D-JNK-1, ein spezifisches zellgängiges, proteaseresistentes Peptid, welches die c-Jun-N-terminale Kinase hemmt, die Inflamationsreaktion und das Ausmaß der hepatischen Schädigung nach H/R vermindert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob auch bei einem durch chronischen Ethanolabusus vorgeschädigten Organismus, die D-JNK-1 Gabe zu einer Abschwächung der Inflammation im Tiermodell führt. Des Weiteren sollte auch die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der Inflamationskaskade unter D-JNK-1 Gabe bei der chronisch ethanolvorgeschädigter Leber genauer betrachtet werden.

Wir arbeiteten mit einem H/R Modell, sowie einem etablierten chronischen Ethanol Fütterungsregime mittels Lieber-DeCarli Diät. Die Versuchstiere erhielten nach der Durchführung von Hämorrhagie vor der Reperfusion eine D-JNK-1- oder NaCl-Gabe. Zwei Stunden nach Beendigung des Versuches wurden Leberenzyme, Lactatdehydrogenase und pro-inflammatorische Zytokine im Serum sowie die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Mediatoren im Lebergewebe untersucht. Die Aktivität von NF- $\kappa$ B und c-Jun wurde durch Nachweis der relativen Proteinexpression mittels Westernblot quantifiziert. Zusätzlich wurde die NF- $\kappa$ B Aktivierung immunhistologisch durch die GFP Färbung untersucht. Der Leberschaden wurde histologisch mittels HE-Färbung nachgewiesen.

Durch eine 4-wöchige chronische ethanolhaltige Fütterung wird bei den Versuchstieren eine *Steatosis hepatis*, mit den entsprechenden strukturellen und funktionellen Veränderungen ausgelöst. Durch zusätzliche Durchführung der H/R-Prozedur wird eine relevante hepatische Schädigung sowie Inflamationsreaktion ausgelöst. NF- $\kappa$ B und c-Jun spielen in der Regulation der Inflamationsreaktion nach H/R-Trauma eine wesentliche Rolle. Durch die chronische Ethanol-Fütterung

## **Zusammenfassung**

---

kommt es ebenso wie durch die H/R-Prozedur zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und wenn auch in geringerem Ausmaß von c-Jun.

Die Intensität der durch H/R-Trauma ausgelösten Inflammationsreaktion und des Gewebeschadens in der durch chronischen ethanolgeschädigten Leber kann durch eine einmalige D-JNK-1 Gabe im Tiermodell nicht wesentlich beeinflusst werden. In der Kontrollgruppe kann durch die D-JNK-1 Applikation jedoch eine Abschwächung der posttraumatischen Inflammationsreaktion beobachtet werden.

Dies führt zu dem Schluss, dass nachdem im ersten Schritt die Grundlagen und Ursachen eines pathologischen Sachverhaltes untersucht wurden, im Anschluss an den zweiten Schritt, der weiterführenden Erforschung und Erarbeitung von therapeutischen Ansätzen, die erarbeiteten Ansätze in Hinsicht auf ihre Wirksamkeit bei Vorliegen weiterer Pathologien nochmals gesondert betrachtet werden müssen. Da das Zusammenspiel verschiedener pathologischer Zustände oftmals zur Zunahme der Komplexität führt und neue Sachverhalte aufzeigt. Jedoch bleibt es in weiterführenden Studien zu untersuchen, ob eine wiederholte Applikation des spezifischen c-Jun Inhibitors oder eine Erhöhung seiner Dosis sowie eine Modulation des Therapiezeitfensters die in vorherigen Studien beobachteten benefiziellen Effekte auch in diesem Modell herbeiführen können.

### 6. Summary

Chronic ethanol (EtOH) abuse worsens pathophysiological derangements after hemorrhagic shock and resuscitation (H/R) that induce hepatic injury and strong inflammatory changes via JNK and NF- $\kappa$ B activation. Inhibiting JNK with a cell-penetrating, protease-resistant peptide D-JNKI-1 after H/R in mice with healthy livers ameliorated these effects. Here, we studied if JNK inhibition by D-JNKI-1 in chronically EtOH-fed mice after hemorrhagic shock prior to the onset of resuscitation also confers protection.

Male mice were fed a Lieber-DeCarli diet containing EtOH or an isocaloric control (ctrl) diet for 4 weeks. Animals were hemorrhaged for 90 min ( $32 \pm 2$  mm Hg) and randomly received either D-JNKI-1 (11 mg/kg, intraperitoneally, i. p.) or sterile saline as vehicle (veh) immediately before the onset of resuscitation. Sham animals underwent surgical procedures without H/R and were either D-JNKI-1 or veh treated. Two hours after resuscitation, blood samples and liver tissue were harvested.

H/R induced hepatic injury with increased systemic interleukin (IL)-6 levels, and enhanced local gene expression of NF- $\kappa$ B-controlled genes such as intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and matrix metalloproteinase (MMP)9. c-Jun and NF- $\kappa$ B phosphorylation were increased after H/R. These effects were further increased in EtOH-fed mice after H/R. D-JNKI-1 application inhibited the proinflammatory changes and reduced significantly hepatic injury after H/R in ctrl-fed mice. Moreover, D-JNKI-1 reduces in ctrl-fed mice the H/R-induced c-Jun and NF- $\kappa$ B phosphorylation. However, in chronically EtOH-fed mice, JNK inhibition did not prevent the H/R-induced hepatic damage and proinflammatory changes nor c-Jun and NF- $\kappa$ B phosphorylation after H/R.

These results indicate, that JNK inhibition is protective only in not pre-harmed liver after H/R. In contrast, the pronounced H/R-induced liver damage in mice being chronically fed with ethanol cannot be prevented by JNK inhibition after H/R and seems to be under the control of NF- $\kappa$ B.

### Literaturverzeichnis

1. Singer SSSTMV. Alkoholassoziierte Organschäden. *Der Internist*. 2002;
2. Spies CD, Neuner B, Neumann T, et al. Intercurrent complications in chronic alcoholic men admitted to the intensive care unit following trauma. *Intensive Care Med*. Apr 1996;22(4):286-93.
3. Herve C, Gaillard M, Roujas F, Huguenard P. Alcoholism in polytrauma. *J Trauma*. Dec 1986;26(12):1123-6.
4. White AM, Castle IP, Hingson RW, Powell PA. Using Death Certificates to Explore Changes in Alcohol-Related Mortality in the United States, 1999 to 2017. *Alcohol Clin Exp Res*. Jan 2020;44(1):178-187. doi:10.1111/acer.14239
5. Honkanen R, Visuri T. Blood alcohol levels in a series of injured patients with special reference to accident and type of injury. *Ann Chir Gynaecol*. 1976;65(4):287-94.
6. Wechsler H, Isaac N. 'Binge' drinkers at Massachusetts colleges. Prevalence, drinking style, time trends, and associated problems. *JAMA*. Jun 3 1992;267(21):2929-31.
7. Jacobs NA, Harris ML, Trew DR. Interrelation between alcohol and accidents. *Journal of the Royal Society of Medicine*. Jul 1989;82(7):447.
8. Greiffenstein P, Mathis KW, Stouwe CV, Molina PE. Alcohol binge before trauma/hemorrhage impairs integrity of host defense mechanisms during recovery. *Alcohol Clin Exp Res*. Apr 2007;31(4):704-15. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00355.x
9. Gaertner Bea. *Alkohol - Zahlen und Fakten zum Konsum*. Lengerich: Pabst; 2014.
10. Relja B, Hohn C, Bormann F, et al. Acute alcohol intoxication reduces mortality, inflammatory responses and hepatic injury after haemorrhage and resuscitation in vivo. *Br J Pharmacol*. Feb 2012;165(4b):1188-99. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01595.x
11. Phelan H, Stahls P, Hunt J, Bagby GJ, Molina PE. Impact of alcohol intoxication on hemodynamic, metabolic, and cytokine responses to hemorrhagic shock. *J Trauma*. Apr 2002;52(4):675-82.
12. Mors K, Horauf JA, Kany S, et al. Ethanol Decreases Inflammatory Response in Human Lung Epithelial Cells by Inhibiting the Canonical NF-kB-Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(1):17-30. doi:10.1159/000480313
13. Relja B, Henrich D, Wetzel G, et al. Effects of acute ethanol gavage on intestinal integrity after hemorrhage/resuscitation. *Scand J Gastroenterol*. Apr 2013;48(4):448-58. doi:10.3109/00365521.2013.772228
14. Relja B, Menke J, Wagner N, et al. Effects of positive blood alcohol concentration on outcome and systemic interleukin-6 in major trauma patients. *Injury*. Mar 2016;47(3):640-5. doi:10.1016/j.injury.2016.01.016
15. Wagner N, Akbarpour A, Mors K, et al. Alcohol Intoxication Reduces Systemic Interleukin-6 Levels and Leukocyte Counts After Severe TBI Compared With Not Intoxicated TBI Patients. *Shock*. Sep 2016;46(3):261-9. doi:10.1097/SHK.0000000000000620
16. Wagner N, Franz N, Dieteren S, et al. Acute alcohol binge deteriorates metabolic and respiratory compensation capability after blunt chest trauma followed by hemorrhagic shock - a new research model. *Alcohol Clin Exp Res*. Jul 17 2017;doi:10.1111/acer.13446
17. Eguchi A, Franz N, Kobayashi Y, et al. Circulating Extracellular Vesicles and Their miR "Barcode" Differentiate Alcohol Drinkers With Liver Injury and Those Without Liver Injury in Severe Trauma Patients. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:30. doi:10.3389/fmed.2019.00030
18. Wagner N, Relja B, Lustenberger T, et al. The influence of alcohol on the outcome of trauma patients: a matched-pair analysis of the TraumaRegister DGU((R)). *Eur J Trauma Emerg Surg*. Jun 2020;46(3):463-472. doi:10.1007/s00068-019-01231-0
19. Riuttanen A, Jantti SJ, Mattila VM. Alcohol use in severely injured trauma patients. *Sci Rep*. Oct 21 2020;10(1):17891. doi:10.1038/s41598-020-74753-y

20. Pabst Aea. Substanzkonsum und substanzbezogene Störungen in Deutschland im Jahr 2012. *Sucht*, 59(6), 321-331. 2013;
21. Lieber CS, DeCarli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J Hepatol*. May 1991;12(3):394-401.
22. Pequignot H, Etienne JP, Delavierre P, Petite JP. [Primary cancer of the liver in cirrhosis. Increase in the incidence and observation in known and follow-up cirrhotic patients]. *Presse Med*. Dec 2 1967;75(51):2595-600. Cancers primitifs du foie sur cirrhose. Augmentation de frequence et observation chez des cirrhotiques connus et suivis.
23. Wilkinson P, Santamaria JN, Rankin JG. Epidemiology of alcoholic cirrhosis. *Australas Ann Med*. Aug 1969;18(3):222-6.
24. Stinson FS, Grant BF, Dufour MC. The critical dimension of ethnicity in liver cirrhosis mortality statistics. *Alcohol Clin Exp Res*. Aug 2001;25(8):1181-7.
25. Leevy CM, Moroianu SA. Nutritional aspects of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. Feb 2005;9(1):67-81. doi:10.1016/j.cld.2004.11.003
26. Lu XL, Luo JY, Tao M, et al. Risk factors for alcoholic liver disease in China. *World J Gastroenterol*. Aug 15 2004;10(16):2423-6.
27. Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. Jan 1997;25(1):108-11. doi:10.1002/hep.510250120
28. Monto A, Patel K, Bostrom A, et al. Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C-related fibrosis. *Hepatology*. Mar 2004;39(3):826-34. doi:10.1002/hep.20127
29. Altamirano J, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Sep 2011;8(9):491-501. doi:10.1038/nrgastro.2011.134
30. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol*. Jan 2010;105(1):14-32; quiz 33. doi:10.1038/ajg.2009.593
31. European Association for the Study of L. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol*. Aug 2012;57(2):399-420. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.004
32. Monzoni A, Masutti F, Saccoccio G, Bellentani S, Tiribelli C, Giacca M. Genetic determinants of ethanol-induced liver damage. *Mol Med*. Apr 2001;7(4):255-62.
33. Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet*. Oct 14 1995;346(8981):987-90.
34. Williams JA, Manley S, Ding WX. New advances in molecular mechanisms and emerging therapeutic targets in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol*. Sep 28 2014;20(36):12908-12933. doi:10.3748/wjg.v20.i36.12908
35. Eckardt MJ, Rawlings RR, Martin PR. Biological correlates and detection of alcohol abuse and alcoholism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1986;10(2):135-44.
36. Grant BF. Barriers to alcoholism treatment: reasons for not seeking treatment in a general population sample. *J Stud Alcohol*. Jul 1997;58(4):365-71.
37. Levitsky J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. Aug 2004;24(3):233-47. doi:10.1055/s-2004-832937
38. Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Sep 1 2006;841(1-2):96-109. doi:10.1016/j.jchromb.2006.05.005
39. Bode J. *Alkoholismusdiagnostik aus internistischer Sicht*. 1995.
40. Bode J. Klinik und Therapie alkoholischer Leberschäden. *Handbuch Alkohol, Alkoholismus, alkholbedingte Organschäden*. Barth, Leipzig Heidelberg; 2000.
41. G. R. Chronische Leberkrankheiten. In: Rettenmaier G. SK, ed. *Sonographische Differentialdiagnostik, Band 1*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim; 1990.
42. Ryder SD, British Society of G. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults. *Gut*. May 2003;52 Suppl 3:iii1-8.
43. Trebicka J, Gu W, de Ledinghen V, et al. Two-dimensional shear wave elastography predicts survival in advanced chronic liver disease. *Gut*. 2021:gutjnl-2020-323419. doi:10.1136/gutjnl-2020-323419

44. Schneider MD, Zeuzem S, Friedrich-Rust M. Leberzirrhose. *Der Gastroenterologe*. 2016/02/01 2016;11(1):34-39. doi:10.1007/s11377-015-0034-8
45. Tannapfel D, Dienes, Langer, Schirmacher, Aust, Baretton, Dombrowski, Fleig, Herrmann, Kasper, Lüttges, Pfeiffer, Reinacher-Schick, Schmidt, Terraciano, Trauner, Trautwein, . AWMF Leitlinie "Histopathologische Diagnose der nicht-alkoholischen und alkoholischen Fettlebererkrankung". 2009;
46. al He. *Innere Medizin*. 2011.
47. Foster PF, Fabrega F, Karademir S, Sankary HN, Mital D, Williams JW. Prediction of abstinence from ethanol in alcoholic recipients following liver transplantation. *Hepatology*. Jun 1997;25(6):1469-77. doi:10.1002/hep.510250627
48. Singer T. *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten Grundlage- Diagnostik - Therapie 2. Auflage*. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005.
49. Nowak AJ, Relja B. The Impact of Acute or Chronic Alcohol Intake on the NF-kappaB Signaling Pathway in Alcohol-Related Liver Disease. *Int J Mol Sci*. Dec 10 2020;21(24)doi:10.3390/ijms21249407
50. Jin M, Ande A, Kumar A, Kumar S. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell death & disease*. 2013;4:e554. doi:10.1038/cddis.2013.78
51. Bruns T, Trautwein C. Pathogenese und Progression der Leberzirrhose: aktuelle Perspektiven. *Der Gastroenterologe*. 2021/05/01 2021;16(3):137-148. doi:10.1007/s11377-021-00517-3
52. Weiskirchen R, Tacke F. Neue Therapieoptionen für die Leberfibrose. *Der Gastroenterologe*. 2016/02/01 2016;11(1):40-46. doi:10.1007/s11377-015-0026-8
53. Friedman SL. Stellate cell activation in alcoholic fibrosis--an overview. *Alcohol Clin Exp Res*. May 1999;23(5):904-10.
54. A. D. Alcoholic and non alcoholic steatohepatitis. In: Arias IM. BJ, Chisari FV., Fausto N., Schachter D., Shafritz DA., ed. *The liver: biology and pathbiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 1999.
55. Day CP. JO. Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology*. 1998;114:842 - 845.
56. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. Nov 16 2000;343(20):1467-76. doi:10.1056/NEJM200011163432007
57. Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: implications for alcoholic liver disease pathogenesis. *Alcohol Clin Exp Res*. May 2001;25(5 Suppl ISBRA):8S-14S.
58. Thurman RG. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol*. Oct 1998;275(4 Pt 1):G605-11.
59. Bautista AP. Impact of alcohol on the ability of Kupffer cells to produce chemokines and its role in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. Apr 2000;15(4):349-56.
60. Siegmund S, Teyssen S, Singer MV. [Alcohol-associated organ damage. Health sequelae caused by moderate alcohol drinking]. *Internist (Berl)*. Feb 2002;43(2):287-93. Alkoholassoziierte Organschaden. Gesundheitliche Folgen durch moderaten Alkoholkonsum.
61. Parlesak A, Schafer C, Schutz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol*. May 2000;32(5):742-7.
62. Cannon JW. Hemorrhagic Shock. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(4):370-379. doi:10.1056/NEJMra1705649
63. Larsen R. Hämorrhagischer Schock. *Klinikmanual Intensivmedizin* Springer:chap 10.
64. Riede UN. SH. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. vol 4. Georg Thieme Verlag; 1999/2000.
65. Kao RL, Xu X, Xenocostas A, et al. Induction of acute lung inflammation in mice with hemorrhagic shock and resuscitation: role of HMGB1. *Journal of inflammation*. 2014;11(1):30. doi:10.1186/s12950-014-0030-7



66. Yan R, van Meurs M, Popa ER, et al. Early Heterogenic Response of Renal Microvasculature to Hemorrhagic Shock/Resuscitation and the Influence of NF- $\kappa$ B Pathway Blockade. *Shock*. 2019;51(2):200-212. doi:10.1097/shk.0000000000001126
67. Kreimeier U, Lackner CK, Pruckner S, Ruppert M, Peter K. [Permissive hypotension in severe trauma]. *Der Anaesthetist*. Oct 2002;51(10):787-99. Permissive Hypotension beim schweren Trauma. doi:10.1007/s00101-002-0398-2
68. Schulte am Esch J. KE, Bause H. *Duale Reihe Anästhesie und Intensivmedizin* vol 2. Georg Thieme Verlag GmbH; 2000 2002.
69. Adams HA, Baumann G, Gansslen A, et al. [Definition of shock types]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. Nov 2001;36 Suppl 2:S140-3. Definitionen der Schockformen. doi:10.1055/s-2001-18174
70. Adams HA. Zur Diagnostik und Therapie der Schockformen, Empfehlungen der interdisziplinären Arbeitsgruppe Schock der DIVI Teil II. *Anästhesiologie und Intensivmedizin*. 2005(46):p. 111-124.
71. Jeon BR, Yeom DH, Lee SM. Protective effect of allopurinol on hepatic energy metabolism in ischemic and reperfused rat liver. *Shock*. Feb 2001;15(2):112-7.
72. Lehnert M, Arteel GE, Smutney OM, et al. Dependence of liver injury after hemorrhage/resuscitation in mice on NADPH oxidase-derived superoxide. *Shock*. Apr 2003;19(4):345-51.
73. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free radical biology & medicine*. Dec 2013;65:952-68. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.174
74. Mari M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. Jun 1 2010;12(11):1295-331. doi:10.1089/ars.2009.2634
75. Fan J, Li Y, Levy RM, et al. Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *Journal of immunology*. May 15 2007;178(10):6573-80.
76. Robert AM, Robert L. Xanthine oxido-reductase, free radicals and cardiovascular disease. A critical review. *Pathology oncology research : POR*. Jan 2014;20(1):1-10. doi:10.1007/s12253-013-9698-x
77. Labat-Robert J, Robert L. Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. *Pathologie-biologie*. Apr 2014;62(2):61-6. doi:10.1016/j.patbio.2014.02.009
78. Thobe BM, Frink M, Hildebrand F, et al. The role of MAPK in Kupffer cell toll-like receptor (TLR) 2-, TLR4-, and TLR9-mediated signaling following trauma-hemorrhage. *Journal of cellular physiology*. Mar 2007;210(3):667-75. doi:10.1002/jcp.20860
79. Edeas M. [Anti-oxidants, controversies and perspectives: how can the failure of clinical studies using anti-oxidants be explained?]. *Journal de la Societe de biologie*. 2009;203(3):271-80. Anti-oxydants, controverses et perspectives : comment expliquer l'echec des etudes cliniques utilisant des anti-oxydants. doi:10.1051/jbio:2009031
80. Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2008;45(1):1-23. doi:10.1080/10408360701713104
81. Colletti LM KS, Walz A et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1996;23:506-514.
82. Meng ZH DK, Billiar TR et al. . Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C343-C351.
83. Hierholzer C KJ, Omert L et al. Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. . *Am J Physiol Cell Physiol*. 1998;275:611-621.

84. Partrick DA MF, Moore EE, Barnett CC, Jr., Silliman CC. . Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. . *New Horiz* 1996;4(2):194-210.
85. Redl H GH, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. . *Br Med Bull* 1993;49(3):556-565.
86. Meng ZH DK, Billiar TR et al. . Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. . *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:343-351.
87. Relja B TE, Breig L, Henrich D, Schneider H, Marzi I, et al. . Plant polyphenols attenuate hepatic injury after hemorrhage/resuscitation by inhibition of apoptosis, oxidative stress, and inflammation via NF-kappaB in rats. . *Eur J Nutr* 2011;
88. Relja B LM, Seyboth K, Bormann F, Hohn C, Czerny C, et al. . Simvastatin reduces mortality and hepatic injury after hemorrhage/resuscitation in rats. . *Shock*. 2010;34(1):46-54.
89. Relja B SB, Lee VS, Henrich D, Czerny C, Borsello T, et al. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase after hemorrhage but before resuscitation mitigates hepatic damage and inflammatory response in male rats. . *Shock*. 2009;32(5):509-516.
90. Simms H. Polymorphonuclear leukocytes: their role as central cellular elements in shock pathogenesis. . *Shock*. 1995;4:225-231.
91. Rose S FR, Eneff K et al. . Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock*. 1994;1:452-456.
92. Adkison D HM, Benoit JN et al. . Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. . *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:101-107.
93. Bauer C SS, Soule HR et al. . A natural glycoprotein inhibitor (NIF) of CD11b/CD18 reduces leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock. *Shock*. 1995;4:187-192.
94. Childs EW SD, Moncure M et al. . Effect of LFA-1beta antibody on leukocyte adherence in response to hemorrhagic shock in rats. . 2000;14:49-52.
95. Maier M SH, Voges J et al. Attenuation of leukocyte adhesion by recombinant TNF-binding protein after hemorrhagic shock in the rat. . *Shock*. 2003;19(457-461)
96. Akgur FM BM, Zibari GB, McDonald JC, Epstein CJ, Ross CR, et al. . Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression. . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(2):791-797.
97. Holzer K SF, Konietzny P et al. Interleukin 8 mRNA gene expression in peripheral and intra-abdominal neutrophils during human secondary peritonitis. . 2005;23:501-506.
98. Yamakawa Y TM, Patel M et al. . Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation. . *Ann Surg* 2000;231(387-398)
99. Gujral JS BT, Farhood A et al. . Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? . *Hepatology*. 2001;33:397-405.
100. Yang R M-HL, Woodall C et al. . Administration of glutamine after hemorrhagic shock restores cellular energy, reduces cell apoptosis and damage, and increases survival. . *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007;31:94-100.
101. Vanlangenakker N VBT, Krysko DV et al. . Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. . *Curr Mol Med* 2008;8:207-220.
102. Mela L. Altered mitochondrial metabolism in circulatory shock. *Adv Exp Med Biol* 1977;78:371-373.
103. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*. Jan 1999;276(1 Pt 1):G1-6.
104. Zou W, Liu X, Yue P, et al. c-Jun NH2-terminal kinase-mediated up-regulation of death receptor 5 contributes to induction of apoptosis by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oate in human lung cancer cells. *Cancer research*. Oct 15 2004;64(20):7570-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1238
105. Löffler G. PP. *Biochemie und Pathobiochemie*. vol 6. Springer Verlag; 1998.

106. Wagner N, Dieteren S, Franz N, et al. Alcoholinduced attenuation of posttraumatic inflammation is not necessarily liverprotective following trauma/hemorrhage. *International journal of molecular medicine*. Sep 2019;44(3):1127-1138. doi:10.3892/ijmm.2019.4259
107. Zakaria el R, Tsakadze NL, Garrison RN. Hypertonic saline resuscitation improves intestinal microcirculation in a rat model of hemorrhagic shock. *Surgery*. Oct 2006;140(4):579-87; discussion 587-8. doi:10.1016/j.surg.2006.05.015
108. Toth B, Yokoyama Y, Schwacha MG, et al. Insights into the role of interleukin-6 in the induction of hepatic injury after trauma-hemorrhagic shock. *Journal of applied physiology*. Dec 2004;97(6):2184-9. doi:10.1152/jappphysiol.00499.2004
109. Wisse E. Kupffer cell reactions in rat liver under various conditions as observed in the electron microscope. *Journal of ultrastructure research*. Mar 1974;46(3):499-520.
110. Hildebrand F, Hubbard WJ, Choudhry MA, et al. Kupffer cells and their mediators: the culprits in producing distant organ damage after trauma-hemorrhage. *The American journal of pathology*. Sep 2006;169(3):784-94. doi:10.2353/ajpath.2006.060010
111. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Biological significance of elevated TNF levels: in vivo administration of monoclonal antibody against tnf following haemorrhage shock increases the capacity of macrophages to release TNF while restoring immunoresponsiveness. *Cytokine*. Nov 1994;6(6):624-32.
112. Ackermann M, Reuter M, Flohe S, Bahrami S, Redl H, Schade FU. Cytokine synthesis in the liver of endotoxin-tolerant and normal rats during hemorrhagic shock. *J Endotoxin Res*. 2001;7(2):105-12.
113. Keller SA, Paxian M, Ashburn JH, Clemens MG, Huynh T. Kupffer cell ablation improves hepatic microcirculation after trauma and sepsis. *J Trauma*. Apr 2005;58(4):740-9; discussion 749-51.
114. Hsu CM, Wang JS, Liu CH, Chen LW. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock*. Apr 2002;17(4):280-5.
115. Rhee P, Waxman K, Clark L, et al. Tumor necrosis factor and monocytes are released during hemorrhagic shock. *Resuscitation*. Jun 1993;25(3):249-55.
116. Bahrami S, Yao YM, Leichtfried G, Redl H, Marzi I, Schlag G. Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats. *Am J Physiol*. May 1997;272(5 Pt 2):H2219-26.
117. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *The Journal of surgical research*. Jul 2010;162(1):95-109. doi:10.1016/j.jss.2009.09.019
118. Bernhard M. Woran gehen Herzmuskelzellen zugrunde? — Nekrose, Onkose und Apoptose. *Herz*. 1999;Volume 24(Issue 3): pp 181-188 doi:10.1007/BF03044960
119. Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Jul 1999;13(10):1137-43.
120. Lemasters JJ, DiGuseppi J, Nieminen AL, Herman B. Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*. Jan 1-7 1987;325(6099):78-81. doi:10.1038/325078a0
121. Quesnelle KM, Bystrom PV, Toledo-Pereyra LH. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Archives of toxicology*. Jan 8 2015;doi:10.1007/s00204-014-1437-x
122. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *The Journal of experimental medicine*. Apr 4 2005;201(7):1135-43. doi:10.1084/jem.20042614
123. Tsung A, Zheng N, Jeyabalan G, et al. Increasing numbers of hepatic dendritic cells promote HMGB1-mediated ischemia-reperfusion injury. *Journal of leukocyte biology*. Jan 2007;81(1):119-28. doi:10.1189/jlb.0706468

124. Chang WJ, Toledo-Pereyra LH. The role of HMGB1 and HSP72 in ischemia and reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. Apr 2011;166(2):219-21. doi:10.1016/j.jss.2010.05.013
125. Yang Q, Liu Y, Shi Y, Zheng M, He J, Chen Z. The role of intracellular high-mobility group box 1 in the early activation of Kupffer cells and the development of Con A-induced acute liver failure. *Immunobiology*. Oct 2013;218(10):1284-92. doi:10.1016/j.imbio.2013.04.011
126. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol*. Mar 1991;260(3 Pt 1):G355-62.
127. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*. Jan 12 2017;168(1-2):37-57. doi:10.1016/j.cell.2016.12.012
128. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*. Aug 2011;12(8):695-708. doi:10.1038/ni.2065
129. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell research*. Feb 2011;21(2):223-44. doi:10.1038/cr.2011.13
130. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. Nov 22 1999;18(49):6853-66. doi:10.1038/sj.onc.1203239
131. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. Oct 30 2006;25(51):6680-4. doi:10.1038/sj.onc.1209954
132. Chen FE, Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene*. Nov 22 1999;18(49):6845-52. doi:10.1038/sj.onc.1203224
133. Kany S, Janicova A, Relja B. Innate Immunity and Alcohol. *J Clin Med*. Nov 14 2019;8(11)doi:10.3390/jcm8111981
134. Stein B, Baldwin AS, Jr., Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *The EMBO journal*. Oct 1993;12(10):3879-91.
135. Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, et al. The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Molecular and cellular biology*. Jul 2004;24(14):6488-500. doi:10.1128/MCB.24.14.6488-6500.2004
136. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, et al. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Molecular and cellular biology*. Sep 2004;24(17):7806-19. doi:10.1128/MCB.24.17.7806-7819.2004
137. Kany S, Woschek M, Kneip N, et al. Simvastatin exerts anticancer effects in osteosarcoma cell lines via geranylgeranylation and c-Jun activation. *Int J Oncol*. Apr 2018;52(4):1285-1294. doi:10.3892/ijo.2018.4288
138. Smale ST. Hierarchies of NF-kappaB target-gene regulation. *Nat Immunol*. Aug 2011;12(8):689-94. doi:10.1038/ni.2070
139. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. Apr 10 1997;336(15):1066-71. doi:10.1056/NEJM199704103361506
140. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol*. Aug 2011;12(8):715-23. doi:10.1038/ni.2060
141. Deng Z, Liu D, Fu T, et al. NF-kB mediates early blood-brain barrier disruption in a rat model of traumatic shock. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2019;86(2):240-249. doi:10.1097/ta.0000000000002124
142. Foxwell BM, Bondeson J, Brennan F, Feldmann M. Adenoviral transgene delivery provides an approach to identifying important molecular processes in inflammation: evidence for heterogeneity in the requirement for NFkappaB in tumour necrosis factor production. *Annals of the rheumatic diseases*. Nov 2000;59 Suppl 1:i54-9.
143. Nenci A, Becker C, Wullaert A, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. Mar 29 2007;446(7135):557-61. doi:10.1038/nature05698

144. Relja B, Weber R, Maraslioglu M, et al. Differential Relevance of NF- $\kappa$ B and JNK in the Pathophysiology of Hemorrhage/Resuscitation-Induced Liver Injury after Chronic Ethanol Feeding. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137875. doi:10.1371/journal.pone.0137875
145. Bondeson J, Foxwell B, Brennan F, Feldmann M. Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF- $\kappa$ B inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 11 1999;96(10):5668-73.
146. Perkins ND. The Rel/NF- $\kappa$ B family: friend and foe. *Trends in biochemical sciences*. Sep 2000;25(9):434-40.
147. Dieteren S, Franz N, Kohler K, et al. Ethyl Pyruvate Reduces Systemic Leukocyte Activation via Caspase-1 and NF- $\kappa$ B After Blunt Chest Trauma and Haemorrhagic Shock. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:562904. doi:10.3389/fmed.2020.562904
148. Cui J, Zhang M, Zhang YQ, Xu ZH. JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta pharmacologica Sinica*. May 2007;28(5):601-8. doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00579.x
149. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, et al. MAP kinases. *Chemical reviews*. Aug 2001;101(8):2449-76.
150. Smeal T, Hibi M, Karin M. Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *The EMBO journal*. Dec 15 1994;13(24):6006-10.
151. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta*. Dec 10 1991;1072(2-3):129-57.
152. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Current opinion in cell biology*. Apr 1997;9(2):240-6.
153. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. Apr 30 2001;20(19):2390-400. doi:10.1038/sj.onc.1204383
154. Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*. Sep 8 2005;437(7056):281-5. doi:10.1038/nature03914
155. Marderstein EL, Bucher B, Guo Z, Feng X, Reid K, Geller DA. Protection of rat hepatocytes from apoptosis by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Surgery*. Aug 2003;134(2):280-4. doi:10.1067/msy.2003.237
156. Lehnert M, Relja B, Sun-Young Lee V, et al. A peptide inhibitor of C-jun N-terminal kinase modulates hepatic damage and the inflammatory response after hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*. Aug 2008;30(2):159-65. doi:10.1097/SHK.0b013e31815dd623
157. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, et al. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol*. Jun 2005;42(6):850-9. doi:10.1016/j.jhep.2005.01.030
158. Relja B, Schwestka B, Lee VS, et al. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase after hemorrhage but before resuscitation mitigates hepatic damage and inflammatory response in male rats. *Shock*. Nov 2009;32(5):509-16. doi:10.1097/SHK.0b013e3181a2530d
159. Borsello T, Clarke PG, Hirt L, et al. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nature medicine*. Sep 2003;9(9):1180-6. doi:10.1038/nm911
160. Barr RK, Kendrick TS, Bogoyevitch MA. Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J Biol Chem*. Mar 29 2002;277(13):10987-97. doi:10.1074/jbc.M107565200
161. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 20 2001;98(24):13681-6. doi:10.1073/pnas.251194298
162. Bertelsen M, Sanfridson A. Inflammatory pathway analysis using a high content screening platform. *Assay and drug development technologies*. Jun 2005;3(3):261-71. doi:10.1089/adt.2005.3.261

163. Magness ST, Jijon H, Van Houten Fisher N, Sharpless NE, Brenner DA, Jobin C. In vivo pattern of lipopolysaccharide and anti-CD3-induced NF-kappa B activation using a novel gene-targeted enhanced GFP reporter gene mouse. *Journal of immunology*. Aug 1 2004;173(3):1561-70.
164. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. Aug 1983;72(2):441-54.
165. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, et al. Delivery of IkappaB superrepressor gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Hepatology*. Dec 2001;34(6):1149-57. doi:10.1053/jhep.2001.29400
166. Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology*. Oct 2008;48(4):1224-31. doi:10.1002/hep.22470
167. Bradford BU, O'Connell TM, Han J, et al. Metabolomic profiling of a modified alcohol liquid diet model for liver injury in the mouse uncovers new markers of disease. *Toxicology and applied pharmacology*. Oct 15 2008;232(2):236-43. doi:10.1016/j.taap.2008.06.022
168. Maraslioglu M, Weber R, Korff S, et al. Activation of NF-kappaB after chronic ethanol intake and haemorrhagic shock/resuscitation in mice. *Br J Pharmacol*. Oct 2013;170(3):506-18. doi:10.1111/bph.12224
169. Relja B, Lehnert M, Seyboth K, et al. Simvastatin reduces mortality and hepatic injury after hemorrhage/resuscitation in rats. *Shock*. Jul 2010;34(1):46-54. doi:10.1097/SHK.0b013e3181cd8d05
170. Gupta NA, Kolachala VL, Jiang R, et al. Mitigation of autophagy ameliorates hepatocellular damage following ischemia reperfusion injury in murine steatotic liver. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. Sep 25 2014;doi:10.1152/ajpgi.00210.2014
171. Shi Y, Greven J, Guo W, et al. Trauma-Hemorrhage Stimulates Immune Defense, Mitochondrial Dysfunction, Autophagy, and Apoptosis in Pig Liver at 72 h. *Shock*. May 1 2021;55(5):630-639. doi:10.1097/SHK.0000000000001556
172. Tang Y, Xia XF, Zhang Y, et al. Establishment of an experimental mouse model of trauma-hemorrhagic shock. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 2012;61(4):417-25.
173. Vardanian AJ, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review. *Mol Med*. May-Jun 2008;14(5-6):337-45. doi:10.2119/2007-00134.Vardanian
174. Vetelainen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Annals of surgery*. Jan 2007;245(1):44-50. doi:10.1097/01.sla.0000225253.84501.0e
175. Han JY, Miura S, Akiba Y, et al. Chronic ethanol consumption exacerbates microcirculatory damage in rat mesentery after reperfusion. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. May 2001;280(5):G939-48.
176. Ono M, Yu B, Hardison EG, Mastrangelo MA, Tweardy DJ. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-kappa B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock*. Jun 2004;21(6):519-25.
177. da Silva BS, Rodrigues GB, Rocha SW, et al. Inhibition of NF-kappaB activation by diethylcarbamazine prevents alcohol-induced liver injury in C57BL/6 mice. *Tissue & cell*. Oct 2014;46(5):363-71. doi:10.1016/j.tice.2014.06.008
178. McClain CJ, Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*. Mar 1989;9(3):349-51.
179. Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcohol Clin Exp Res*. Fall 1982;6(4):523-31.

180. Relja B, Horstmann JP. Traumatic Injury. *Exp Suppl.* 2018;108:85-110. doi:10.1007/978-3-319-89390-7\_5
181. Kawatani H, Tsujimoto T, Douhara A, et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators of inflammation.* 2013;2013:495156. doi:10.1155/2013/495156
182. Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cellular & molecular immunology.* Apr 2005;2(2):92-100.
183. Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology.* Oct 2004;40(4):933-41. doi:10.1002/hep.20400
184. Hong F, Kim WH, Tian Z, et al. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. *Oncogene.* Jan 3 2002;21(1):32-43. doi:10.1038/sj.onc.1205016
185. Kamimura S, Tsukamoto H. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology.* Oct 1995;22(4 Pt 1):1304-9.
186. Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I. [Pathophysiology of multiple trauma : intensive care medicine and timing of treatment]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen.* Sep 2013;84(9):753-8. Pathophysiologie des Polytraumas : Intensivmedizin und "Timing" der Versorgung. doi:10.1007/s00104-013-2477-0
187. Stensballe J, Christiansen M, Tonnesen E, Espersen K, Lippert FK, Rasmussen LS. The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality. *Acta anaesthesiologica Scandinavica.* Apr 2009;53(4):515-21. doi:10.1111/j.1399-6576.2008.01801.x
188. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *American journal of physiology Cell physiology.* Feb 2001;280(2):C343-51.
189. Bhaskaran N, Shukla S, Srivastava JK, Gupta S. Chamomile: an anti-inflammatory agent inhibits inducible nitric oxide synthase expression by blocking RelA/p65 activity. *International journal of molecular medicine.* Dec 2010;26(6):935-40.
190. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, et al. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *The Journal of experimental medicine.* Mar 16 1998;187(6):917-28.
191. Kyriakis JM, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem.* Oct 5 1990;265(28):17355-63.
192. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* May 12 1994;369(6476):156-60. doi:10.1038/369156a0
193. Tao X, Wan X, Xu Y, et al. Dioscin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats through inhibition of oxidative-nitrative stress, inflammation and apoptosis. *Transplantation.* Sep 27 2014;98(6):604-11. doi:10.1097/TP.0000000000000262
194. Relja B, Tottel E, Breig L, et al. Effects of green tea catechins on the pro-inflammatory response after haemorrhage/resuscitation in rats. *The British journal of nutrition.* Jun 28 2011;105(12):1791-7. doi:10.1017/S000711451000560X
195. Lu WJ, Lin KH, Tseng MF, et al. New therapeutic strategy of hinokitiol in haemorrhagic shock-induced liver injury. *J Cell Mol Med.* Mar 2019;23(3):1723-1734. doi:10.1111/jcmm.14070

---

## **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Einfluss des selektiven Inhibitors der c-Jun N-terminalen Kinase D-JNK-1 nach Hämorrhagie/Reperfusionstrauma bei chronisch ethyltoxisch vorgeschädigter Leber“  
in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Zentrum der Chirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Borna Relja mit Unterstützung durch Prof. Dr. Ingo Marzi und Prof. Dr. Mark Lehnert, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

- Als wissenschaftlicher Artikel mit dem Titel:

B. Relja, R. Weber, M. Maraslioglu, N. Wagner, T. Borsello, C. Jobin, I. Marzi, M. Lehnert  
“Differential relevance of NF- $\kappa$ B and JNK in the pathophysiology of hemorrhage/resuscitation-induced liver injury after chronic ethanol feeding”  
PLoS One. 2015 Sep 14;10(9):e0137875. doi: 10.1371/journal.pone.0137875.  
eCollection 2015

Frankfurt am Main, 16.12.2021

(Ort, Datum)

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift)