

Diplomarbeit

**Differentielle Effekte von Gallensäuren auf
Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen**

eingereicht von

Wilhelmer Patricia

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klin. Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie

unter der Anleitung von

Dr.ⁱⁿ med. univ. Elisabeth Krones

Univ.-Prof. Dr. med. univ. Peter Fickert

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 29.07.2016

Patricia Wilhelmer eh.

Danksagungen

Ich möchte mich bedanken bei:

meinen Eltern,

die mir nicht nur aus finanzieller Sicht das Studium ermöglichten, sondern mir seit jeher die Freiheit ließen, meinen eigenen Weg zu gehen und die mich stets, so gut sie konnten, dabei unterstützten.

Prof. Dr. Peter Fickert,

dass ich Teil seiner Arbeitsgruppe sein durfte und dadurch einen wertvollen Einblick in die medizinische Grundlagenforschung und das wissenschaftliche Arbeiten gewinnen konnte.

Dr.in Elisabeth Krones,

welche mir in jeder Phase der Diplomarbeit mit ihrer fachlichen Kompetenz, ihren konstruktiven Rückmeldungen und ihren hilfreichen Anregungen zur Seite stand und viel Geduld mit mir hatte.

Dr.in Silvia Maria Racedo,

ohne deren tatkräftige Unterstützung und jederzeitige Hilfsbereitschaft bei der Planung und Durchführung der Experimente diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Die Zeit des Studierens in Graz war eine unvergesslich schöne und prägende Zeit, in der mich viele wunderbare Menschen begleiteten. Jedem Einzelnen gilt an dieser Stelle mein Dank!

Zusammenfassung

Hintergrund

Innerhalb der letzten Jahre mehrten sich die Berichte über histomorphologische renale Veränderungen bei cholestatischen Lebererkrankungen. Das Krankheitsbild der cholämischen Nephropathie (CN) rückt kompensatorisch renal eliminierte Gallebestandteile in den Fokus der Pathogenese. Die Gallengangligatur (CBDL) bei Mäusen stellt ein etabliertes Modell für CN dar (Fickert, Krones et al., *Hepatology* 2013). Die CN kann durch Modifikation des Gallensäurepools verhindert werden (z.B. Fütterung der hydrophilen *nor*Ursodeoxycholsäure, *nor*UDCA), was die Bedeutung renal eliminiertes Gallensäuren in der Pathogenese der CN unterstreicht. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber unklar. Ziel dieser Arbeit war die Testung der Zytotoxizität verschiedener potentiell renal eliminiertes Gallensäuren auf Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen.

Methoden

Zwei renale Zelllinien (mIMCD3, murine Sammelrohrepithelzellen; MDCK, Tubulusepithelzellen) wurden für 3 bis 24 Stunden mit verschiedenen Gallensäuren (Cholsäure [CA], Chenodeoxycholsäure [CDCA], Taurocholsäure [TCA], Taurochenodeoxycholsäure [TCDCA], *nor*Ursodeoxycholsäure [*nor*UDCA]) in aufsteigenden Konzentrationen (50 µM-3 mM) oder Serum von ikterischen CBDL Mäusen inkubiert. Der Zytotoxizitätsnachweis wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Assay erbracht.

Ergebnisse

Für TCDCA und CDCA wurde auf beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Toxizität gegenüber der Negativkontrolle (Medium) gefunden. Bei Inkubation der Zellen mit CA und *nor*UDCA wurden auch bei Dosisescalationen bis zu 3 mM keine zytotoxischen Effekte detektiert. TCA zeigte in der Mehrzahl der Versuche keinerlei Zytotoxizität, sodass auch hier eine fehlende zytotoxische Wirkung angenommen werden kann. Auch die Behandlung der Zellen mit Serum von cholestatischen CBDL Mäusen zeigte keine signifikanten zytotoxischen Effekte.

Diskussion

Potentiell toxische und bei Cholestase renal eliminierte Gallensäuren wie TCDCA und CDCA führen konzentrationsabhängig zum Zelltod von Epithelzellen des distalen Nephrons. Für *norUDCA*, eine hydrophile Gallensäure, die im Mausmodell der CN zu einer Verbesserung des Phänotyps in der Niere führte und deren klinischer Einsatz bei primär sklerosierender Cholangitis (PSC) derzeit intensiv beforscht wird, wurden keine zytotoxischen Effekte gefunden. Aufgrund der zentralen Rolle von Gallensäuren in der Entstehung eines akuten Nierenversagens bei cholestatischen Lebererkrankungen, könnte *norUDCA* künftig eine Therapieoption bei prädisponierten PatientInnen darstellen.

Abstract

Background

Cholemic nephropathy (CN) is an umbrella term describing renal dysfunction and typical histological changes in patients with jaundice. Central pathogenetic concepts include renal elimination of potentially toxic bile acids (BAs). Common bile duct ligation (CBDL) in mice represents an established *in vivo* model for studying CN (Fickert, Krones et al., Hepatology 2013). The renal phenotype in CN can be ameliorated by modification of the bile acid pool (e.g. prefeeding of hydrophilic *nor*Ursodeoxycholic acid, *nor*UDCA), which emphasizes the role of alternative urinary elimination of potentially toxic bile acids in the pathogenesis of CN. The underlying mechanisms are, however, not fully understood. The aim of this study was to test the cytotoxicity of different bile acids on renal tubular epithelial cells.

Methods

Two renal cell lines (mIMCD-3, murine collecting duct cells; MDCK, renal tubular epithelial cells) were incubated for 3 to 24 hours with different BAs (cholic acid [CA], chenodeoxycholic acid [CDCA], taurocholic acid [TCA], taurochenodeoxycholic acid [TCDCA], *nor*Ursodeoxycholic acid [*nor*UDCA] at incremental concentrations (50 μ M-3 mM) or serum from jaundiced CBDL mice. Cytotoxicity was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Results

For CDCA and TCDCA we observed a concentration-dependent cytotoxic effect compared to control in both cell lines. Incubation with CA or *nor*UDCA, even at concentrations up to 3 mM, did not show any significant cytotoxic effects. TCA did not show any cytotoxic effect in the majority of the experiments. Furthermore no cytotoxic effect was detected with incubation with serum from jaundiced mice.

Discussion

Potentially toxic BAs, which are alternatively eliminated in urine under cholestatic conditions caused concentration-dependent cell death of renal epithelial cells. *Nor*UDCA,

a hydrophilic BA, which is currently being investigated for cholestatic liver disease in clinical studies, did not show any cytotoxic effects. Due to the pivotal role of BAs in the pathogenesis of cholemic nephropathy, *norUDCA* could represent a future treatment option.

Inhaltsverzeichnis

EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG	I
DANKSAGUNGEN	II
ZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	V
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
TABELLENVERZEICHNIS	XIV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Niere bei Lebererkrankungen	1
1.1.1 Prävalenz und Ursachen.....	1
1.1.2 Das hepatorenale Syndrom (HRS) Typ I.....	2
1.1.3 Evaluierung der Nierenfunktion bei Lebererkrankungen.....	3
1.2 Die Niere bei Cholestase – Cholämische Nephropathie	4
1.2.1 Was bedeutet Cholestase?.....	5
1.2.2 Historisches zur cholämischen Nephropathie.....	6
1.2.3 Pathogenesekonzepte.....	7
1.2.4 Histologische Veränderungen bei CN.....	9
1.2.5 Klinische Manifestation.....	9
1.3 Die Galle	10
1.3.1 Die Gallensäuren.....	10
1.3.2 Die physiologische Funktion von Gallensäuren.....	10
1.3.3 Synthese von GS.....	11
1.3.3.1 Primäre Gallensäuren.....	11
1.3.3.2 Sekundäre Gallensäuren.....	13
1.3.4 Der GS-Pool des Menschen und der Maus.....	14

1.3.5	Der GS-Pool bei Cholestase.....	14
1.3.6	Intra- und extrazelluläre Toxizität.....	15
1.3.7	Enterohepatischer Kreislauf.....	16
1.3.8	Alternative Zirkulationswege.....	17
1.3.9	Hepatobiliäre Transportsysteme.....	18
1.3.10	Alternative Exkretionswege.....	19
1.3.11	Kernrezeptoren.....	20
1.4	<i>Fragestellung, Hypothese und Ziele</i>	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	<i>Zellkultur - Allgemeines</i>	23
2.1.1	MDCK-Zelllinie.....	23
2.1.2	mIMCD-3-Zelllinie.....	23
2.1.3	Kultivierung der Zellen.....	24
2.1.3.1	Zellerhalt.....	25
2.1.3.2	Kryokonservierung der Zellen.....	27
2.1.3.3	Auftauen der Zellen.....	27
2.2	<i>Versuchsaufbau</i>	28
2.2.1	Kultivierung der Zellen in 24-Well-Platten.....	28
2.2.2	Herstellung der Stocks.....	28
2.2.3	Herstellung der Verdünnungsreihen.....	29
2.2.4	Treatment der Zellen mit Gallensäuren und ikterischem Serum.....	29
2.3	<i>Vitalitätstest</i>	30
2.3.1	Durchführung des MTT-Assays.....	31
2.4	<i>Immunzytochemie</i>	32
2.4.1	Caspase-3 Nachweis.....	32
2.4.1.1	Methodenprinzip.....	33

2.5	<i>Auswertung der durchgeführten Experimente</i>	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	<i>Übersicht</i>	35
3.2	<i>Wirkung von CA auf mIMCD-3-Zellen</i>	35
3.3	<i>Wirkung von CA auf MDCK-Zellen</i>	36
3.4	<i>Wirkung von TCA auf mIMCD-3-Zellen</i>	37
3.5	<i>Wirkung von TCA auf MDCK-Zellen</i>	37
3.6	<i>Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen</i>	38
3.7	<i>Wirkung von TCDCA auf MDCK-Zellen</i>	40
3.8	<i>Wirkung von CDCA auf mIMCD3-Zellen</i>	41
3.9	<i>Wirkung von CDCA auf MDCK-Zellen</i>	43
3.10	<i>Wirkung von norUDCA auf mIMCD-3-Zellen</i>	44
3.11	<i>Wirkung von norUDCA auf MDCK-Zellen</i>	45
3.12	<i>Wirkung von ikterischem Serum auf mIMCD-3-Zellen</i>	45
3.13	<i>Caspase-3-Nachweis</i>	46
4	DISKUSSION	48
4.1	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	48
4.2	<i>Ergebnisse des Caspase-3-Assays</i>	51
4.3	<i>Fehlerquellen und Limitationen</i>	51
4.4	<i>Möglichkeiten zur Verbesserung</i>	53
4.4.1	<i>norUDCA – eine mögliche Therapieoption bei CN?</i>	53
4.5	<i>Zusammenfassung</i>	56
5	REFERENZEN	57
6	ANHANG	66

Glossar und Abkürzungen

ADH	Antidiuretisches Hormon
ANV	Akutes Nierenversagen
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
BME	Basal medium Eagle
BSEP	Canalicular bile salt export pump
CA	Cholic acid (Cholsäure)
CAR	Constitutive androstane receptor
Caspase	Cystein-aspartat spezifische Protease
CBDL	Common bile duct ligation
CDCA	Chenodeoxycholic acid (Chenodeoxycholsäure)
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CN	Cholämische Nephropathie
CystC	Cystatin C
DCA	Deoxycholic acid (Deoxycholsäure)
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-Diamine Tetraacetic acid
et al.	Et alli/aliae – und andere
FBS	Fetal bovine serum (fetales Kälberserum)
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GCA	Glycocholic acid (Glykocholsäure)
GCDCA	Glycochenodeoxycholic acid (Glykochenodeoxycholsäure)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HPF	High-power-field
HRS	Hepatorenales Syndrom
IAC	International Ascites Club
LCA	Lithocholic acid (Lithocholsäure)
LTX	Lebertransplantation
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MDCK	Madin-Darby canine kidney

MELD-score	Model for end-stage liver disease-score
mIMCD-3	Mouse inner medullary connecting duct-3
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MW	Mittelwert
NGAL	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
NorUDCA	<i>Nor</i> Ursodeoxycholic acid (<i>nor</i> Ursodesoxycholsäure)
NTCP	Na ⁺ -Taurocholat-Co-Transporter
OATP	Organic anion transporting protein
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PPARα	Peroxisome proliferated-activated receptor alpha
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PXR	Pregnane X receptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reactiv oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	Rounds per minute
TCA	Taurocholic acid (Taurocholsäure)
TCDC	Taurochenodeoxycholic acid (Taurochenodeoxycholsäure)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromids

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der Entstehung einer Cholestase	5
Abbildung 2: Cholämische Nephropathie	8
Abbildung 3: Typische histomorphologische Veränderungen	9
Abbildung 4: Strukturformel der primären GS	11
Abbildung 5: Gallensäuresynthese.....	12
Abbildung 6: Strukturformel sekundärer GS	13
Abbildung 7: Gallensäurepool des Menschen und der Maus	14
Abbildung 8: Zeitabhängige Veränderung der GS-Konzentrationen.....	15
Abbildung 9: Zirkulationswege der Gallensäuren	17
Abbildung 10: Hepatobiliäre Transportsysteme	18
Abbildung 11: Kompensatorisch renale Elimination	20
Abbildung 12: Reinraumwerkbank und Inkubator	24
Abbildung 13: Verdünnungsreihe	29
Abbildung 14: Reaktion von Tetrazoliumbromid zu Formazan.....	30
Abbildung 15: 24-Well Platten nach Inkubation mit MTT-Lösung	31
Abbildung 16 – Diagramm: Wirkung von CA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h	36
Abbildung 17 – Diagramm: Wirkung von CA auf MDCK-Zellen nach 24h	36
Abbildung 18 – Diagramm: Wirkung von TCA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h	37
Abbildung 19 – Diagramm: Wirkung von TCA auf MDCK-Zellen nach 24h	38
Abbildung 20 – Diagramm: Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 6h.....	39
Abbildung 21 – Diagramm: Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 12h.....	39
Abbildung 22 – Diagramm: Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h.....	40
Abbildung 23 – Diagramm: Wirkung von TCDCA auf MDCK-Zellen nach 24h	41
Abbildung 24 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 3h.....	42
Abbildung 25 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h.	42
Abbildung 26 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf MDCK-Zellen nach 3h	43
Abbildung 27 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf MDCK-Zellen nach 24h.....	44
Abbildung 28 – Diagramm: Wirkung von norUDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h.....	44
Abbildung 29 – Diagramm: Wirkung von norUDCA auf MDCK-Zellen nach 24h.....	45

Abbildung 30 – Diagramm: Wirkung von ikterischem Serum auf MDCK-Zellen nach 12h. 46

Abbildung 31: Caspase-3 Nachweis..... 47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen und Häufigkeiten des ANV bei Lebererkrankungen	2
Tabelle 2: Verwendete Gallensäuren	28
Tabelle 3: Verwendete Antikörper	33

1 Einleitung

1.1 Die Niere bei Lebererkrankungen

Störungen der Nierenfunktion sind kritische Komplikationen bei PatientInnen mit akuten und chronischen Lebererkrankungen, die einhergehen mit einer signifikant erhöhten Morbidität und Mortalität (1-3). Die zentrale prognostische Bedeutung der Nierenfunktion bei Lebererkrankungen wird reflektiert durch das Einbeziehen des Serum-Kreatinins als Kriterium in den Model of End Stage Liver Disease Score (MELD-Score), welcher als guter Prädiktor für die 3-Monats-Mortalität gilt, und derzeit für die Priorisierung von Lebertransplantationen (LTX) herangezogen wird (2,4).

1.1.1 Prävalenz und Ursachen

Bei ca. 20 % der hospitalisierten PatientInnen mit Leberzirrhose wird das Auftreten eines akuten Nierenversagens (ANV)¹ beschrieben. Darunter entfällt die Mehrheit mit 68 % auf prärenale Ursachen, ausgelöst durch:

- Infektion und Sepsis (6,7)
- Hypovolämie (Varizenblutungen, Flüssigkeitsverlust aufgrund Erbrechen, Durchfall, Diuretikatherapie) (8,9)
- Vasodilatoren (2,9)
- Renale Hypoperfusion (aufgrund NSAR-Therapie) (2,9)

Das hepatorenale Syndrom (HRS) Typ I nimmt hierbei eine Sonderposition ein.

¹ Das akute Nierenversagen wird vom Acute Kidney Injury Network (AKIN-Definition) definiert als eine plötzlich (innerhalb von 48 Stunden) einsetzende Nierenfunktionsstörung mit

- einer absoluten Zunahme des Serum-Kreatinins um $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,4$ μ mol/L)
- bzw. einer prozentuellen Zunahme des Serum-Kreatinins $\geq 50\%$ oder
- einer Urinausscheidung von $\leq 0,5$ ml/kg Körpergewicht pro Stunde über ≥ 6 Stunden (5).

Renale Ursachen, zum Großteil aufgrund einer akuten Tubulusnekrose, gelten mit etwa 1/3 der Fälle als zweithäufigste Ursache des ANV bei Lebererkrankungen. Eine akute Tubulusnekrose ist meistens die Folge eines ischämischen Ereignisses, ausgelöst durch Hypovolämie bei Sepsis oder Blutung und kann daher theoretisch durch jede prärenale Ursache bedingt sein (2). Zusätzlich können der Einsatz von Röntgen-Kontrastmittel und die Applikation von Aminoglykosidantibiotika infolge einer direkten Tubulotoxizität zur akuten Tubulusnekrose führen (9).

Postrenale Ursachen stellen mit einer Häufigkeit von weniger als 1 % eine Seltenheit dar (2).

prärenal (68 %)	intrarenal (32 %)	postrenal (<1 %)
<ul style="list-style-type: none"> • Infektion, Sepsis, Hypovolämie (66 %) • HRS Typ 1/2 (34 %) 	<ul style="list-style-type: none"> • akute Tubulusnekrose • Glomerulonephritis 	<ul style="list-style-type: none"> • Obstruktion

Tabelle 1: Ursachen und Häufigkeiten des ANV bei Lebererkrankungen (2)

1.1.2 Das hepatorenale Syndrom (HRS) Typ I

Mit einem Auftreten von bis zu 40 % bei PatientInnen mit Leberzirrhose ist vor allem das hepatorenale Syndrom als Ursache des ANV bei Lebererkrankungen klinisch von Bedeutung (10). Es wird beschrieben als eine progrediente und progressive, aber generell reversible Abnahme der Nierenfunktion in Verbindung mit einer schweren Leberschädigung (11). Typischerweise spricht es nicht auf Volumensubstitution an (2). Die Pathophysiologie ist komplex und multifaktoriell. Eine zentrale Rolle spielt die Vasodilatation im Splanchnikusgebiet, hervorgerufen durch Substrate wie Stickstoffmonoxid, Kohlenmonoxid und endogene Cannabinoide, die in Folge der portalen Hypertension freigesetzt werden und somit den Reiz zur renalen Vasokonstriktion darstellen (11). Des Weiteren scheinen eine gesteigerte bakterielle Translokation, eine gesteigerte mesenterielle Angiogenese und ein vermindertes Ansprechen des Splanchnikusgebietes auf Vasokonstriktoren zusätzlich zur Vasodilatation beizutragen (12-14).

Da dem HRS Typ I ein funktionelles Problem zugrunde liegt, kommt es *per definitionem* zu keinen strukturellen Nierenveränderungen (2,15).

Nun aber häufen sich in der Literatur die Beschreibungen von strukturellen Nierenveränderungen bei PatientInnen mit Leberzirrhose (16). In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist, dass bei bis zu 85 % der PatientInnen mit der Diagnose HRS eine Ansammlung von abgeschilferten Epithelzellen in den Tubuluslichtungen, sogenannte *bile casts*, und somit entgegen der Definition des HRS, strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden konnten (17). Aufgrund der Annahme, dass dem HRS hämodynamische Ursachen zugrunde liegen, stellt die Therapie der Wahl die Behandlung mit einem Vasokonstriktor, Terlipressin, dar. Diese Behandlung zeigt aber nur in 24-58 % an Effektivität (18-22). Gemäß der aktuellen Konzeption zur Pathogenese des HRS, welches als potentiell reversibel gilt, sollte sich die Nierenfunktion bei einem/r Patienten/Patientin mit HRS nach Lebertransplantation (LTX) wieder verbessern. In bis zu 21 % der Fälle kommt es jedoch 30 Tage nach der Transplantation zu keiner Verbesserung (23,24).

1.1.3 Evaluierung der Nierenfunktion bei Lebererkrankungen

Die Evaluierung der Nierenfunktion bei Lebererkrankungen ist hinsichtlich Therapie und Prognose von großer Wichtigkeit, gestaltet sich aber schwierig.

Kreatinin entsteht aus Kreatin und wird für die Energieversorgung der Muskulatur benötigt. Die Menge an produziertem Kreatinin ist abhängig von individueller Muskelmasse, körperlicher Aktivität, Geschlecht und Alter (25). Die Creatinin-Clearance und die auf Kreatinin basierenden Näherungsformeln (Cockcroft-Gault, MDRD [Modification of Diet in Renal Disease], CKD-EPI [Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration]) sind daher keine idealen Parameter, da deren Verwendung aufgrund von Muskeldystrophie, eingeschränkter Leberfunktion, Malnutrition und vermehrter tubulärer Sekretion dazu tendieren lässt, die Nierenfunktion zu überschätzen (26-28).

Cystatin C (CystC), ein Protein, das in konstanter Menge von allen kernhaltigen Zellen produziert und fast ausschließlich glomerulär filtriert wird (29), gilt im Vergleich zu Kreatinin als unabhängig von Muskelmasse, Geschlecht und Alter. Daher ist die Messung

der CystC-Clearance in der Evaluierung der Nierenfunktion bei Lebererkrankungen der Messung von Kreatinin zwar etwas überlegen, weist aber dennoch Limitationen auf (25,30), da die Höhe des CystC von Faktoren wie Infektionen, diversen Medikamenten (Kortikosteroide, ACE-Hemmer, Calcineurininhibitoren) und niedrigem Serum-Albumin beeinflusst werden kann (31). Die direkte Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mittels exogenen Markern wie z.B. Inulin oder Iohexol gilt als Goldstandard. Diese ist aber aufwändig und teuer und daher im klinischen Alltag, vor allem bei wiederholten Messungen, nicht geeignet (14,32).

Die Diagnostik struktureller Nierenveränderungen erweist sich als besondere Herausforderung, da diese mangels Alternativen eine Biopsie verlangt. Aufgrund der gestörten Blutgerinnung und der Komorbiditäten bei Hepatopathien gilt eine standardmäßige Biopsie allerdings als riskant (26).

Das gehäufte Auftreten von strukturellen Nierenveränderungen bei PatientInnen mit der Diagnose HRS, das fehlende Ansprechen von Terlipressin bei der Behandlung eines HRS und das Ausbleiben einer Besserung der Nierenfunktion nach LTX, führen zur Vermutung, dass die aktuellen Pathogenesekonzepte zum Nierenversagen bei Lebererkrankungen nicht vollständig sind. Zusätzlich bestehen die Problematik des akkuraten Erhebens der Nierenfunktion und die Tatsache, dass strukturelle Nierenveränderungen aufgrund mangelnder diagnostischer Alternativen zu einer Biopsie nicht routinemäßig erfasst werden können (28,33).

1.2 Die Niere bei Cholestase – Cholämische Nephropathie

Es ist ein lange bekanntes klinisches Phänomen, dass PatientInnen mit cholestatischen Erkrankungen ein erhöhtes Risiko haben, ein ANV zu entwickeln (33-36). Nun häufen sich die Beschreibungen von strukturellen Nierenveränderungen bei PatientInnen mit Ikterus. In einer klinisch-pathologischen Studie wurden Gewebeproben von 44 PatientInnen mit Cholestase histomorphologisch untersucht. Insgesamt konnten in über 50 % der Proben *bile casts* nachgewiesen werden (17).

Die cholämische Nephropathie (CN) beschreibt dieses in Vergessenheit geratene Krankheitsbild, bei dem es bei PatientInnen mit cholestatischen Lebererkrankungen zum Auftreten typischer histomorphologischer Veränderungen mit Einschränkung der Nierenfunktion und/oder akutem Nierenversagen kommt (33).

1.2.1 Was bedeutet Cholestase?

Cholestase bedeutet wörtlich „Gallestauung“. Hierbei kommt es zum Rückstau und Akkumulation von Gallensäuren, Bilirubin und anderen Bestandteilen der Galle; entweder durch einen funktionellen Defekt bei der Gallensäuresynthese auf Ebene der Hepatozyten oder durch einen verminderten Abfluss der Galle in die Gallengänge (siehe Abbildung 1) (37).

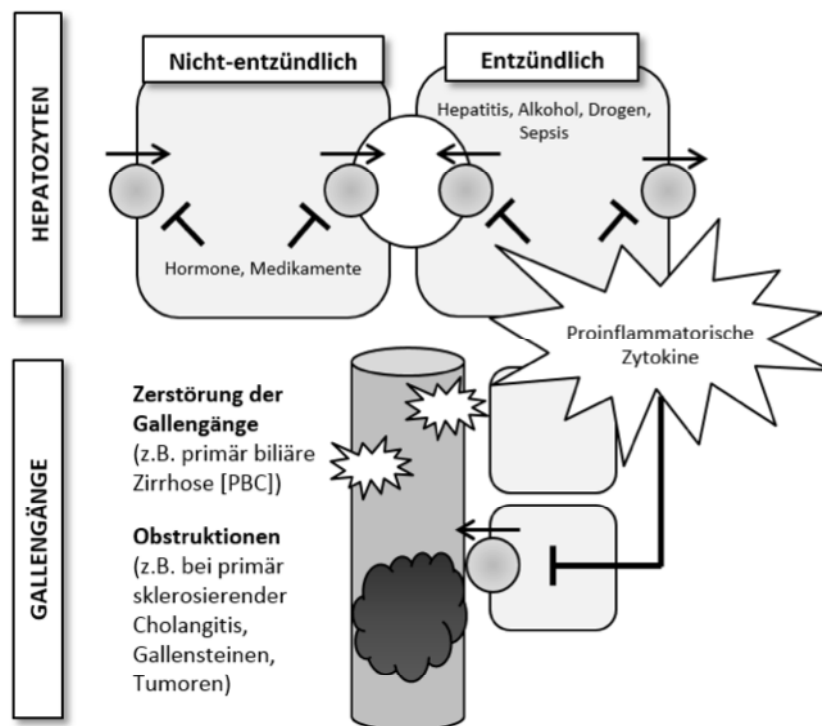


Abbildung 1: Mechanismen der Entstehung einer Cholestase, adaptiert nach (37). Der Defekt kann auf Höhe der Hepatozyten oder auf Höhe der Gallengänge liegen. Auf Höhe der Hepatozyten kann zwischen nicht inflammatorischen (ausgelöst durch Hormone und Medikamente) und inflammatorischen (ausgelöst durch Sepsis, Alkohol, Drogen, Hepatitis) Geschehen unterschieden werden. Auf Höhe der Gallengänge kann die Beeinträchtigung entweder durch eine Obstruktion (aufgrund von Tumoren, Steinen, PSC) oder durch eine Zerstörung der Gallengänge (bei PBC) hervorgerufen werden.

Auf Ebene der Hepatozyten unterscheidet man zwischen nicht-entzündlicher Genese, ausgelöst durch Hormone oder Medikamente und entzündlicher Cholestase aufgrund von proinflammatorischen Zytokinen, welche bei Sepsis, viraler Hepatitis, exzessivem Alkohol- oder Drogenabusus freigesetzt werden.

Auf Höhe der Gallengänge kann die Störung entweder durch eine Zerstörung der Gallengänge (z.B. bei primär biliärer Cholangitis [PBC]) oder durch eine Obstruktion (z.B. bei primär sklerosierender Cholangitis [PSC], Steinen, Tumoren) bedingt sein.

Von Kupfferzellen oder vom Epithel der Gallengänge produzierte proinflammatorische Zytokine können die Expression von cholangiozellulären und hepatozellulären Transportern beeinträchtigen. Des Weiteren existieren eine Reihe von seltenen, genetischen Defekten, die zu Cholestase führen können (siehe Abbildung 1) (37).

1.2.2 Historisches zur cholämischen Nephropathie

Obwohl schon lange ein Zusammenhang zwischen cholestatischen Lebererkrankungen und der Entwicklung eines Nierenversagens vermutet wird, wird die CN von der modernen Literatur vernachlässigt (35,38).

Bereits 1911 beobachteten Clairmont und Von Haberer einen direkten Zusammenhang zwischen Cholestase und dem Auftreten eines ANV. Sie beschrieben fünf ikterische, aber ansonsten gesunde PatientInnen, bei denen aufgrund von Gallensteinen eine Cholezystektomie durchgeführt wurde. Alle starben postoperativ an einem oligurischen Nierenversagen. Dawson et al. postulierten, dass diese Fälle nichts mit dem HRS zu tun hätten (35). Weitere ähnliche Fallberichte erschienen und schon damals wurde direkte Toxizität von Gallensäuren auf die Niere als mögliche Ursache diskutiert (35). In experimentellen Studien aus den 1980er-Jahren an gallengangligierten Hunden konnten charakteristische histomorphologische Veränderungen auf Ebene der proximalen Tubuli nachgewiesen werden (36). In den 80er- und 90er-Jahren häuften sich die Fallberichte über Kinder mit cholestatischen Lebererkrankungen und dem Auftreten von tubulointerstitiellen Veränderungen mit histologischen Ähnlichkeiten. Alle zeigten eine interstitielle Fibrose, Atrophie und Dilatation der Tubuli. Da diese Konstellation an klinischen und pathologischen Merkmalen auf keine geläufige Diagnose passte, vermutete man dahinter eine neue Entität oder eine seltene Form des HRS (39-42).

1.2.3 Pathogenesekonzepte

Die Hypothesen zur Pathogenese in der Literatur sind vielfältig. Die Erklärungsversuche reichen von oxidativem Stress, aufgrund von durch GS ausgelöste Stimulation der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), über hämodynamische Ursachen bis hin zu direkter Toxizität (35,38,43-46). Obwohl es experimentelle Studien zur antioxidativen und nephroprotektiven Wirkung von Bilirubin auf die Niere gibt (47-50), verdächtigen etliche Autoren immer wieder Bilirubin als möglichen Trigger für Tubulusepithelschädigungen bei CN (43,46,51).

Auch eine systemische Endotoxämie, verursacht durch eine gesteigerte Translokation von Darmbakterien aufgrund des intestinalen Mangels an Gallensäuren und in weiterer Folge eine Toll-like Rezeptoren medierte Entzündungsreaktion, stand als Ursache zur Diskussion (52,53).

Neuere Pathogenesekonzepte rücken kompensatorisch renal ausgeschiedene Gallensäuren in den Fokus der Pathogenese (33,54). Bei cholestatischen Lebererkrankungen werden alternative Exkretionswege über die basolaterale Membran der Hepatozyten in den systemischen Kreislauf eröffnet. Die Gallensäuren werden in der Folge zu einem großen Teil glomerulär filtriert aber auch aktiv tubulär sezerniert und schließlich über den Urin eliminiert. Dies schützt zwar die Hepatozyten vor Akkumulation potentiell toxischer Gallensäuren, könnte aber eine Bedrohung für die Nierenepithelzellen darstellen.

Im Tiermodell der gallengangsligierten Maus (common bile-duct ligated; CBDL), welches die extremste Form der Cholestase darstellt, konnte unlängst die zentrale pathogenetische Bedeutung der kompensatorisch renalen Elimination von Gallensäuren aufgezeigt werden (54). CBDL-Mäuse zeigten eine initiale Schädigung im Bereich der Sammelrohre nach bereits drei Tagen, gefolgt von interstitiellen nephritischen Veränderungen und tubulointerstitieller Fibrose nach 6-8-wöchiger Gallengangsligatur. Durch Modifikation des Gallensäurepools durch Fütterung der hydrophilen und renal eliminierten *nor*Ursodeoxycholsäure (*nor*UDCA) oder Verwendung von Farnesoid X Rezeptor-Knockout-Mäusen (FRX-/-), welche einen hydrophileren GS-Pool aufweisen, konnte der Entstehung dieser strukturellen Veränderungen entgegengewirkt werden (54).

Dies unterstreicht die Hypothese, dass Gallensäuren als Trigger in der Pathogenese der CN fungieren. Aufgrund der Schädigung scheint es zu einer interstitiellen Entzündungsreaktion mit nachfolgender Entstehung von interstitieller Nephritis und tubulointerstitieller Fibrose zu kommen (54,55).

Möglicherweise führt die Formation von *bile casts*, ähnlich der Genese bei Schädigungen der Niere beim multiplen Myelom (Myeloma Cast Nephropathie), zur Obstruktion im Tubulussystem, was die Entzündungsreaktion verstärken und somit zusätzlich zur Entstehung von interstitieller Nephritis und tubulointerstitieller Fibrose beitragen könnte (56,57).

Der detaillierte Pathomechanismus ist ungeklärt.

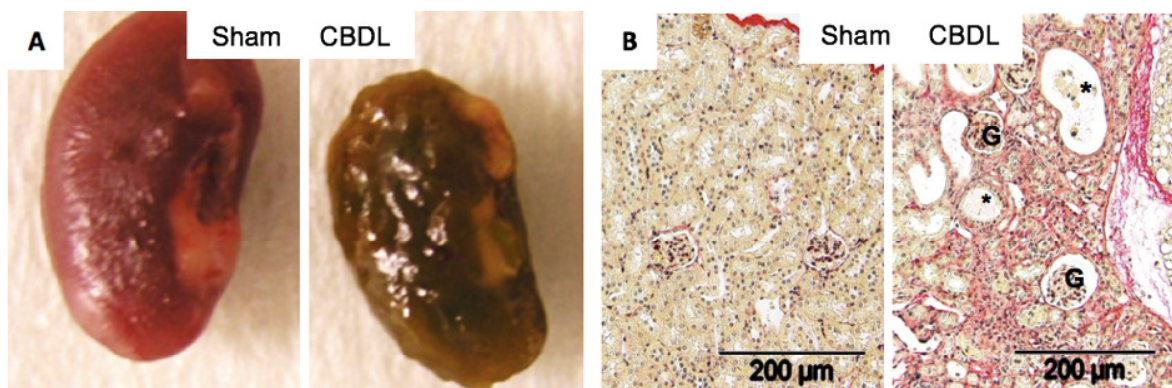


Abbildung 2: Cholämische Nephropathie, adaptiert nach (54). (A) Im Vergleich zu den Nieren einer scheinoperierten Maus (links) erscheinen die Nieren einer 8 Wochen CDBL Maus in ihrer Größe deutlich verkleinert, die Oberfläche unregelmäßig und das Colorit grünlich. (B) Siriusrot-Färbung eines Nierenpräparates einer scheinoperierten Maus (links) und einer 8-Wochen CDBL Maus (rechts). Das Präparat rechts zeigt betont tubulointerstitielle Nephritis und Fibrose mit dilatierten Tubuli (schwarze Sternchen). G = Glomeruli. Vergrößerung x 200.

1.2.4 Histologische Veränderungen bei CN

Die histomorphologischen Veränderungen treten insbesondere auf Höhe der Tubuli der distalen Nephronsegmente auf. Der Grad der Schädigung reicht von milden Schädigungen bis hin zur akuten Tubulusnekrose (17,33,58,59). Relativ konstant wird das Auftreten von sogenannten *bile casts*, welche aus Gallebestandteilen, abgeschilferten Epithelzellen und Zelldetritus zu bestehen scheinen, beschrieben (17,33,43,59-61). Es werden auch Schäden auf Höhe der Glomeruli im Sinne einer Glomerulonephritis oder Glomerulosklerose beschrieben (62).

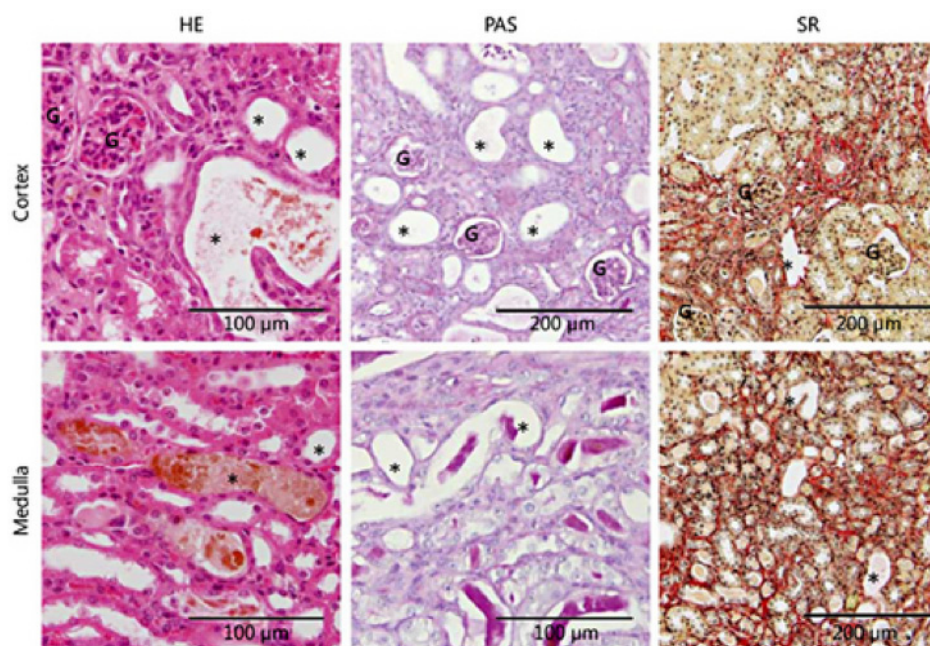


Abbildung 3: Typische histomorphologische Veränderungen, adaptiert nach (55). Hämatoxylin und Eosin (HE), PAS und Siriusrot-Färbung von Gewebeproben einer 8 Wochen CBDL-Maus. Es zeigen sich dilatierte Tubuli (schwarze Sternchen) und intraluminale Cast-Formationen. G = Glomeruli

1.2.5 Klinische Manifestation

Das Spektrum der klinischen Manifestation der CN zeigt sich ebenso variabel wie die histomorphologischen Veränderungen. Es reicht von milden Veränderungen ohne Einschränkung der Nierenfunktion bis hin zu extensiver akuter Tubulusnekrose und akutem Nierenversagen (38,43,59).

1.3 Die Galle

Die Galle besteht mit über 80 % zum größten Teil aus Wasser. Die funktionell wichtigsten Bestandteile der Galle sind Gallensäuren (Gallensalze), Cholesterin, Phospholipide (Lezithin) und Gallenfarbstoffe (Hämoglobinabbauprodukte, vor allem Bilirubin).

1.3.1 Die Gallensäuren

Gallensäuren werden von den Hepatozyten aus Cholesterin synthetisiert und stellen wasserlösliche, amphiphatische² Endprodukte des Cholesterinstoffwechsels dar (63). Das Grundgerüst einer GS besteht aus einer Carboxyl³-Seitenkette, die entweder konjugiert oder unkonjugiert sein kann und aus einem Steroidgerüst, bestehend aus 24 C-Atomen. Die verschiedenen GS unterscheiden sich hinsichtlich Anzahl, Position und Konfiguration der am Steroidgerüst gebundenen Hydroxylgruppen (63).

1.3.2 Die physiologische Funktion von Gallensäuren

Aufgrund ihres chemischen Charakters besitzen Gallensäuren die Fähigkeit Mizellen auszubilden und sind so im Stande lipophile Substanzen zu emulgieren. Dies ist zum einen unabdingbar bei der Aufnahme von Nahrungsfetten³ und den fettlöslichen Vitaminen A, D, E und K aus dem Dünndarm und zum anderen bei der Elimination von Cholesterin und anderen lipophilen Substanzen wie Medikamente und Bilirubin aus dem Organismus.

Die Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren trägt maßgeblich zur Elimination von Cholesterin bei.

Ferner fungieren Gallensäuren als negativer Feedbackmechanismus auf die Gallensäure- und Cholesterinbiosynthese. Ist die Konzentration von GS in den Hepatozyten hoch, so wird die *de-novo*-Synthese reduziert und *vice versa* (63).

² Amphiphatisch bedeutet, dass Moleküle einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil besitzen. Dadurch sind sie sowohl in unpolaren als auch in polaren Lösungsmitteln löslich.

³ Carboxylgruppen sind chemische Gruppen in organischen Verbindungen, die aus einem Kohlenstoff-, zwei Sauerstoff- und einem Wasserstoffatom bestehen (-COOH).

Innerhalb der letzten Dekade wurde bekannt, dass Gallensäuren Liganden an speziellen Kernrezeptoren (z.B. Farnesoid X Rezeptor siehe 1.3.11.) sind und daher eine zentrale Rolle bei diversen Signaltransduktionsvorgängen in der Zelle einnehmen. Somit sind sie maßgeblich an der Regulation des Lipid- und Glukosehaushaltes, sowie an der Regulation der Thermogenese und der Regeneration der Leber beteiligt. Des Weiteren verhindern sie durch ihre antimikrobielle Wirkung ein überschießendes bakterielles Wachstum im Dünndarm (64-70).

1.3.3 Synthese von GS

1.3.3.1 Primäre Gallensäuren

Die primären GS CA und CDCA entstehen in den Hepatozyten durch Hydroxylierung aus Cholesterol. Katalysiert wird dieser Vorgang durch die 7 α -Hydroxylase (CYP7A1), welche das Schrittmacherezym darstellt. CA besitzt drei OH-Gruppen (C-3, C-7, C-12), CDCA besitzt zwei OH-Gruppen (C-3, C-7) (siehe Abbildung 4).

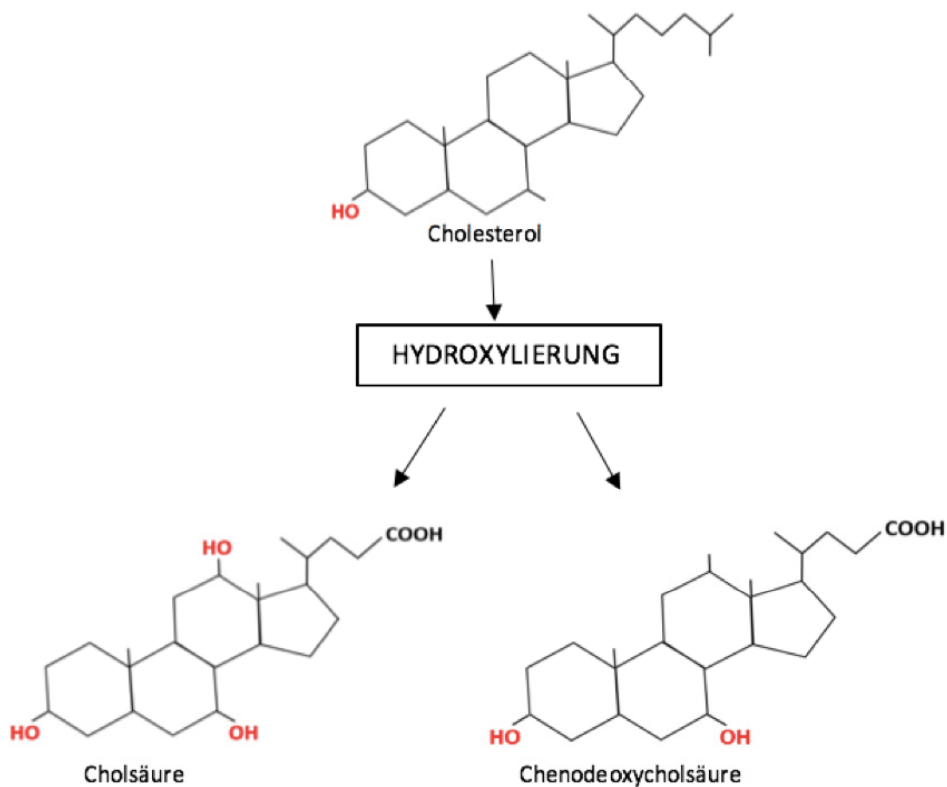


Abbildung 4: Strukturformel der primären GS. Durch Hydroxylierung entstehen aus Cholesterol die primären GS Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA).

Unter physiologischen Bedingungen werden Gallensäuren mit 75 % überwiegend über diesen Weg synthetisiert. Die Leber verfügt als einziges Organ über alle notwendigen Enzyme zur Synthese der primären GS CA und CDCA (69).

Ein alternativer Weg gewinnt vor allem bei Hepatopathien an Bedeutung. Er beginnt mit dem Enzym Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1), welches zusätzlich zu der Leber in Makrophagen und den meisten anderen Geweben exprimiert wird und führt über die mitochondriale 25-Hydroxycholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7B1) zur Bildung von CDCA (siehe Abbildung 5) (69,71,72).

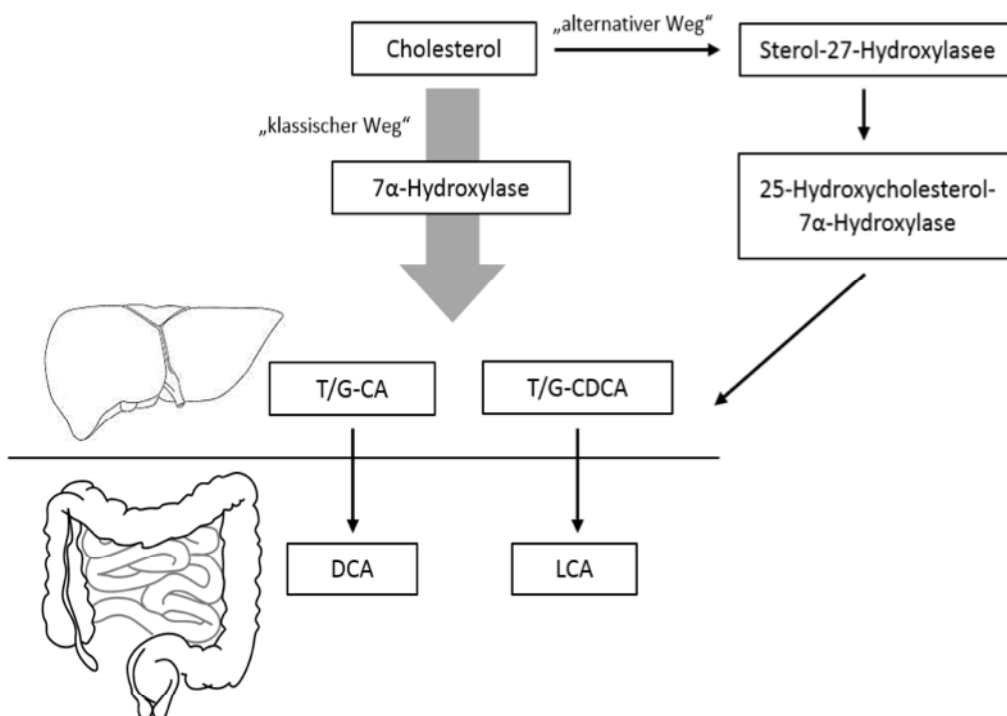


Abbildung 5: Gallensäuresynthese. In der Leber erfolgt die Synthese in die zwei primären Gallensäuren CA und CDCA. Die 7 α -Hydroxylase leitet den klassischen Weg der Gallensäuresynthese in der Leber ein, die Sterol-27-Hydroxylase leitet den alternativen Weg in der Leber und den Makrophagen ein. CA und CDCA werden mit Glycin und Taurin konjugiert. Im Darmtrakt kommt es zur Dekonjugation der konjugierten Gallensäuren G/T-CA und G/T-CDCA und danach zur Dehydroxylierung an C7, wodurch schließlich die sekundären Gallensäuren DCA und LCA entstehen.

Vor der Sekretion in die Galle werden die primären GS CA und CDCA mit Glycin oder Taurin konjugiert (N-Acetyl-Amidierung). Es entstehen somit Glykocholsäure (GCA) und Taurocholsäure (TCA) bzw. Glykochenodeoxycholsäure (GCDCA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) (69,71,73).

1.3.3.2 Sekundäre Gallensäuren

Durch Anaerobier im Darmlumen kommt es zu Dekonjugation und Dehydroxylierung an C7. Es entstehen die um jeweils eine Hydroxylgruppe gekürzten, sekundären Gallensäuren Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) (69). DCA verfügt nun über zwei Hydroxylgruppen an den Positionen C-3 und C-12 und LCA verfügt nur mehr über eine Hydroxylgruppe an der Position C-3 (siehe Abbildung 6) (63).

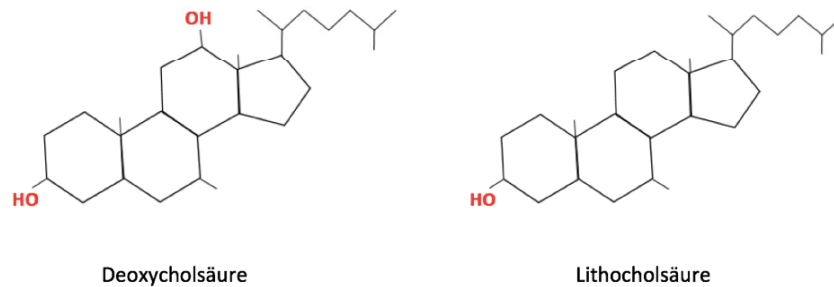


Abbildung 6: Strukturformel sekundärer GS

Die sekundären GS werden im Darm größtenteils in den enterohepatischen Kreislauf eingeschleust und gelangen somit zurück in die Leber. DCA wird erneut konjugiert und sezerniert und zirkuliert im enterohepatischen Kreislauf weiter.

LCA wird konjugiert und zusätzlich an der Position C-3 sulfatiert. Im Gegensatz zu den Konjugaten von DCA, werden die Konjugate von LCA im Dünndarm nicht mehr aufgenommen und somit direkt aus dem Körper ausgeschieden. Dies ist auch wünschenswert, da LCA eine hydrophobe und daher zytotoxische GS ist (74).

GS kommen hauptsächlich in ihrer konjugierten Form vor. Beim Menschen werden die Gallensäuren mehrheitlich mit Glycin (75 %) konjugiert, währenddessen bei der Maus mehrheitlich Taurinkonjugate vorliegen (70). Durch die Konjugation werden die Gallensäuren polarer und dadurch wasserlöslicher. Sie besitzen somit eine verminderte Permeabilität durch Zellmembranen und daher eine verminderte Zytotoxizität (69,70,74). Die konjugierte Form ist überdies widerstandsfähiger gegen Ausfällung der GS in saurem Milieu (75). Bei physiologischen pH-Werten liegen sie in der anionischen Salzform vor und werden daher auch als Gallensalze bezeichnet (69,71).

1.3.4 Der GS-Pool des Menschen und der Maus

Der GS-Pool des Menschen unterscheidet sich grundsätzlich von dem der Maus. Beim Menschen kommen Großteils die primären GS CA, CDCA und DCA vor, währenddessen bei Mäusen CA und β -Muricholsäure überwiegen (76).

Die Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) kommt in beiden Organismen nur in Spuren vor. Diese GS ist der GS CDCA bis auf eine Hydroxylgruppe an der Position C-7 ident (63). Insgesamt besteht der GS-Pool der Maus hauptsächlich aus hydrophilen GS und unterscheidet sich somit erheblich vom hydrophoberen GS-Pool des Menschen, hauptsächlich bestehend aus CDCA, CA und DCA (siehe Abbildung 7) (69).

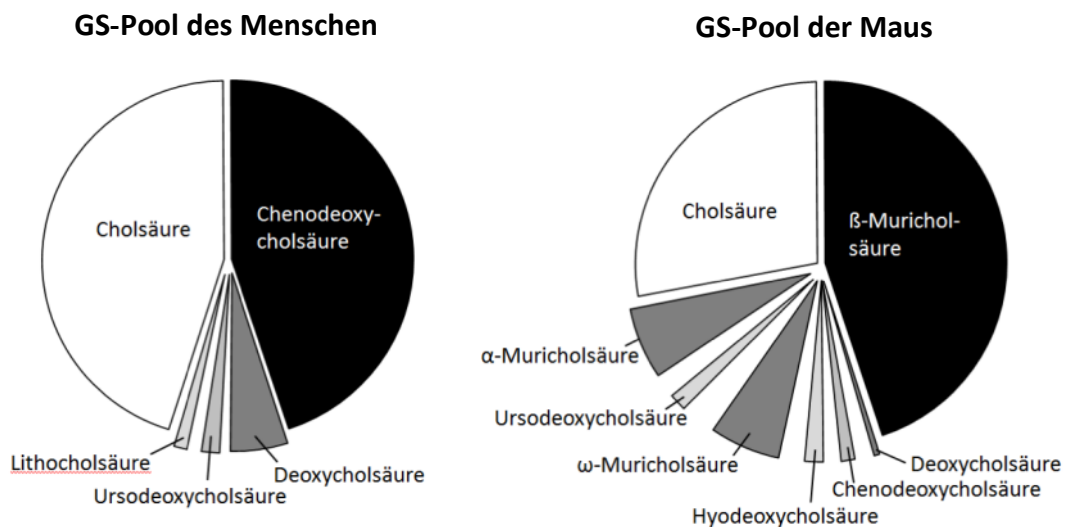


Abbildung 7: Gallensäurepool des Menschen und der Maus, adaptiert nach (76). Gallensäurepool beim Menschen (links) und bei der Maus (rechts). Beim Menschen kommen größtenteils Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) vor, währenddessen bei der Maus hauptsächlich β -Muricholsäure und Cholsäure vorkommen.

1.3.5 Der GS-Pool bei Cholestase

Der GS-Pool des Menschen und der Maus unterliegt bei Cholestase starken Veränderungen in der Zusammensetzung und ändert sich abhängig von der Dauer der Cholestase (77,78).

Im Tiermodell an gallengangsligierten Mäusen machen TCA und T β -MCA mengenmäßig den weitaus größten Anteil im Serum aus und bleiben über die gesamte Dauer der Gallengangsligatur (in diesem Versuch 14 Tage) signifikant erhöht. Die Konzentration der hydrophoben GS TCDCA steigt zwar nach drei Tagen an, hat aber insgesamt nur einen geringen Anteil am gesamten GS-Pool. CA und CDCA steigen unmittelbar nach

Gallengangsligatur an, fallen aber nach einem Tag wieder auf das Niveau von scheinoperierten Mäusen (siehe Abbildung 8). Insgesamt entsteht ein hydrophilerer Pool mit polyhydroxilierten GS (77).

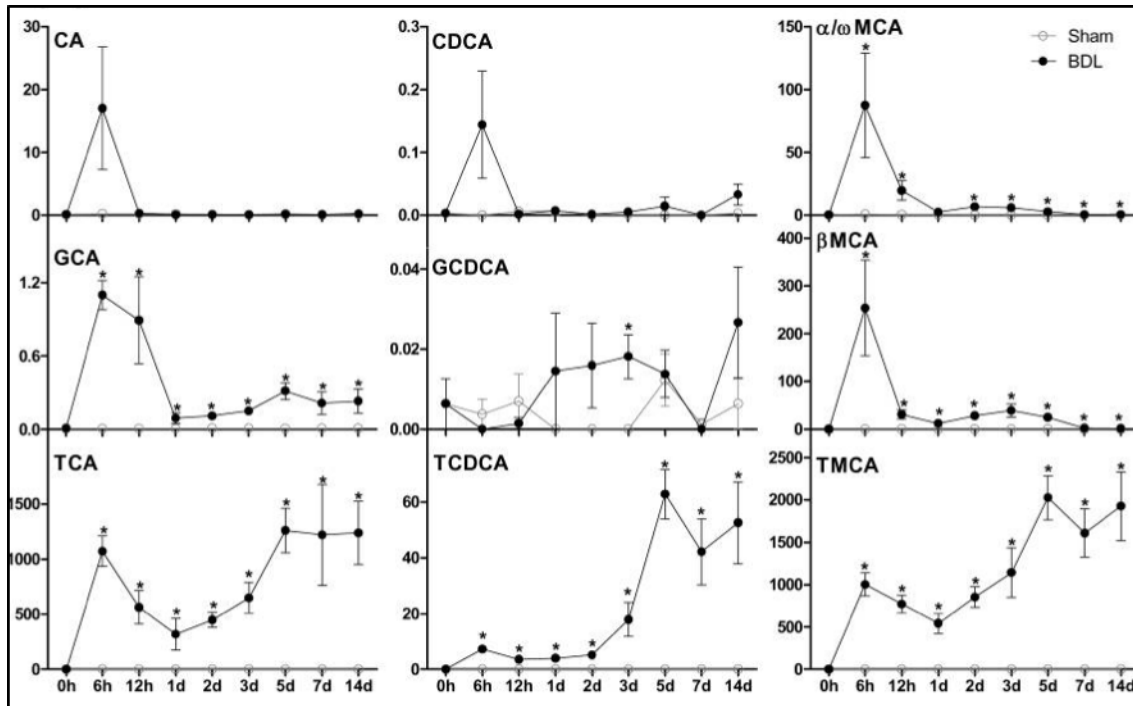


Abbildung 8: Zeitabhängige Veränderung der GS-Konzentrationen (77)

Beim Menschen steigen vor allem TCDCA, GCDCA, TCA und GCA im Serum sehr stark an, während es bei CA und CDCA, welche bei physiologischen Bedingungen die dominanten GS darstellen, sogar zu einer Abnahme der Konzentration kommt (78). Im Urin kommt es ebenfalls zum Anstieg der Konjugate von CDCA und CA. Das Ausmaß des Anstiegs ist aber geringer als im Serum. Beim Menschen entsteht unter cholestatischen Bedingungen zwar insgesamt auch ein hydrophilerer GS-Pool, es bleibt aber dennoch ein signifikanter Anstieg der Konjugate von CDCA nachweisbar (78).

1.3.6 Intra- und extrazelluläre Toxizität

Gallensäuren wirken in unphysiologischen Mengen sowohl intra- als auch extrazellulär toxisch auf Hepatozyten und Cholangiozyten. Die Wasserlöslichkeit und analog dazu die Zytotoxizität werden durch die Anzahl und die Position der Hydroxylgruppen am Steroidgerüst bestimmt. Daraus ergibt sich: je hydrophiler die jeweilige GS ist, desto

weniger toxisch wirkt sie. Überdies bewirkt die Konjugation mit Taurin oder Glycin zusätzlich eine Erhöhung der Hydrophilität. Unkonjugierte, hydrophobe GS gelten daher als toxischer, da sie ungehindert in Zellen diffundieren können (70,76,79).

Die Wasserlöslichkeit und damit deren Toxizität in aufsteigender Reihenfolge lautet wie folgt:

hydrophil - UDCA > CA > CDCA > DCA > LCA – hydrophob (70,76).

Mittels Transporter in Hepatozyten aufgenommene konjugierte GS werden durch Proteine aus dem Zytosol gebunden und können canaliculär ausgeschieden werden. Übersteigt die Konzentration an GS die Bindungsfähigkeit der zytosolischen Proteine, kommt es in den Hepatozyten zur Zerstörung der Mitochondrien. Dies führt zu Nekrose oder Apoptose. Unkonjugierte GS sind in *in vitro* Modellen stark toxisch, da sie die Zellmembran leicht penetrieren und akkumulieren können (63).

Fehlen entsprechende Transporter zur Aufnahme von GS, sind diese erst toxisch, wenn ihre Konzentration die Fähigkeit zur Mizellenbildung übersteigt. Dies erklärt die bei physiologischen Bedingungen fehlende Toxizität von GS auf das Gallengangssystem und den Dünndarm. In Mdr2 (Abcb4)-Knockout Mäusen, bei denen die Phospholipidsekretion in die Galle gehemmt und somit die Fähigkeit zur Mizellenbildung eingeschränkt ist, führen GS zum Lösen der Lipidkomponenten aus den Zellmembranen von Leber- und Gallengangsepithelzellen und damit zu deren Destruktion (63,70,80).

1.3.7 Enterohepatischer Kreislauf

Der weitaus größte Anteil an Gallensäuren durchläuft den enterohepatischen Kreislauf. Dabei werden die Gallensäuren nach der Synthese in den Hepatozyten in die Gallenkanalikuli abgegeben und gelangen vorerst über die Gallengänge in die Gallenblase (64,81). Bei Bedarf werden diese in das Duodenum sezerniert. Größtenteils (> 90 %) werden diese im terminalen Ileum aufgenommen und gelangen über die portalvenöse Zirkulation zurück zur Leber, wo sie von den Hepatozyten erneut aufgenommen und

sezerniert werden. Sie fungieren als negative Rückkoppelungshemmung auf die Aktivität der 7 α -Hydroxylase, dem Schrittmacherenzym der Gallensäure-Biosynthese (81).

Der Gallensäurepool eines Erwachsenen beträgt ca. 2-4 g. Unter physiologischen Bedingungen zirkuliert der Pool 5- bis 10-mal pro Tag im enterohepatischen Kreislauf, was einer täglichen Gallensäureexkretion von 20-40 g entspricht. Da der enterohepatische Kreislauf hocheffizient funktioniert, muss nur der tägliche Verlust über den Stuhl von 0,3 - 0,6 g durch die *de-novo*-Synthese der Leber ausgeglichen werden (82).

1.3.8 Alternative Zirkulationswege

Gallensäuren, die dem enterohepatischen Kreislauf entkommen, werden glomerulär filtriert, im proximalen Tubulus reabsorbiert und zurück zur Leber transportiert (hepatorenal Zyklus). Demnach ist der Verlust an Gallensäuren bei physiologischen Bedingungen über den Urin ebenfalls gering.

Unter physiologischen Bedingungen ist der Anteil an GS, der diesen alternativen Kreislauf durchläuft, vernachlässigbar gering. Erst wenn die Zirkulation im enterohepatischen Kreislauf gestört ist, gewinnt dieser alternative Eliminationsweg an Bedeutung (83).

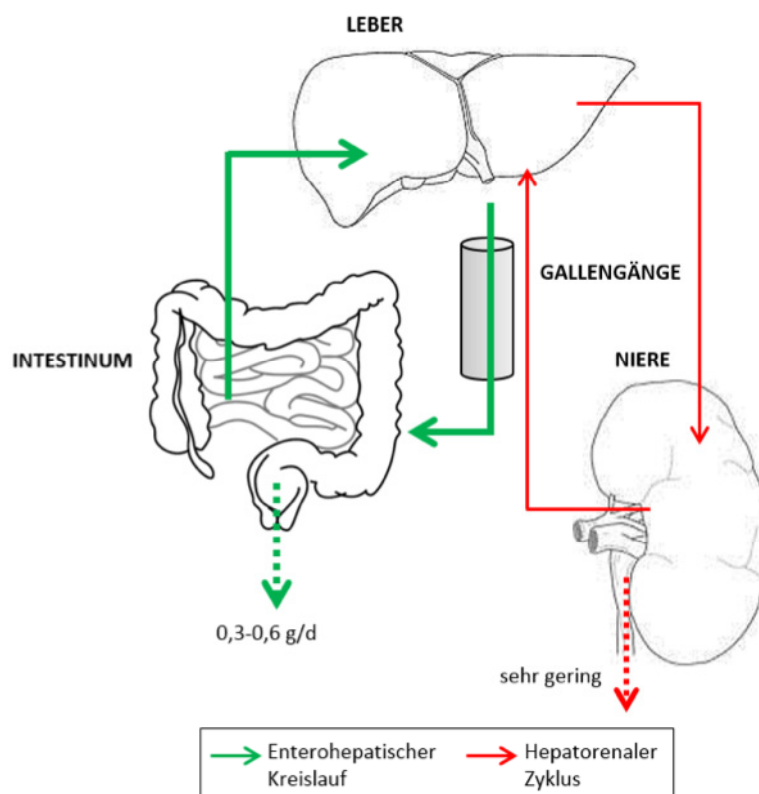


Abbildung 9: Zirkulationswege der Gallensäuren

1.3.9 Hepatobiliäre Transportsysteme

GS kommen hauptsächlich in ihrer konjugierten Form vor, was zwar eine unkontrollierte Diffusion verhindert, aber spezielle Transporter zur Aufnahme notwendig macht (84). Unter physiologischen Bedingungen werden die Gallensäuren von den Transportern NTCP (Na⁺-Taurocholat-Co-Transporter) und OATP2/OATP1B1 (organic anion transporting proteins) an der basolateralen Membran der Hepatozyten aufgenommen und über BSEP (canalicular bile salt export pump; ABCB2) und MRP2 in die Gallengänge abgegeben. Über MDR2/3 werden Phospholipide transportiert, welche zusammen mit Gallensäuren und Cholesterol Mizellen in der Galle bilden. Im terminalen Ileum werden die Gallensäuren hauptsächlich sekundär-aktiv über den ASBT (apical sodium-dependent bile acid transporter) in die Enterozyten aufgenommen, gelangen über die Transporter OST α / β und MRP3 in die portalvenöse Zirkulation und gelangen so schließlich wieder in die Leber. Transporter für GS werden auch an extrahepatischen Geweben wie Cholangiozyten und proximalen Nierentubulusepithelzellen exprimiert, wodurch bei cholestatischen Bedingungen alternative Exkretionswege eröffnet werden können (85,86).

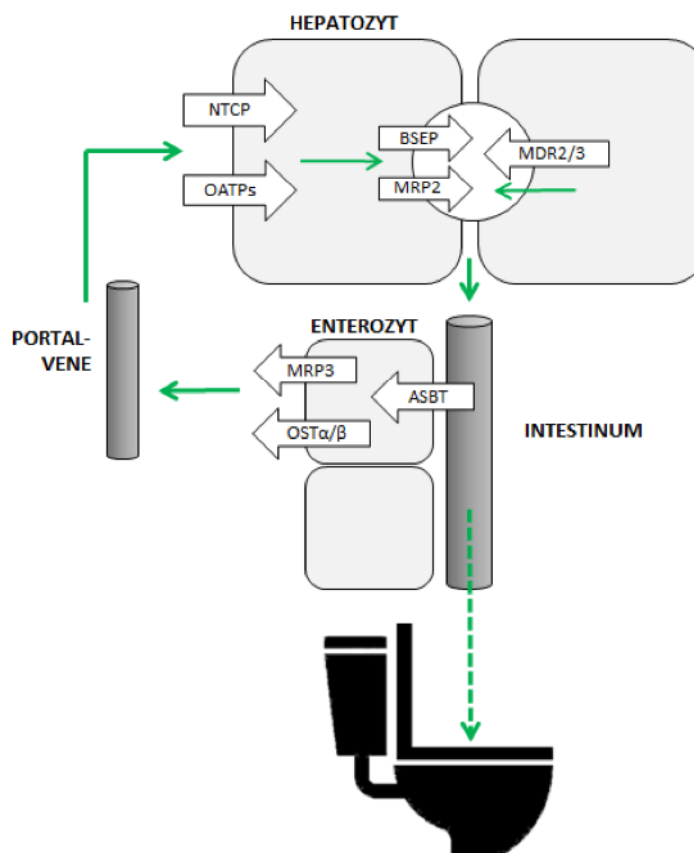


Abbildung 10: Hepatobiliäre Transportsysteme. Pfeile in grün stellen den enterohepatischen Kreislauf dar, gestrichelter Pfeil: Elimination der GS über den Stuhl.

1.3.10 Alternative Exkretionswege

Um die Hepatozyten bei Cholestase vor Akkumulation von potentiell toxischen Gallensäuren zu schützen, kommt es zur Aktivierung einer komplexen Maschinerie an koordinierten Mechanismen. Zum einen wird die basolaterale Aufnahme über die Transporter NTCP und OATP2 gehemmt, gleichzeitig gewinnt ein alternativer Weg basolateral über das Pfortaderblut an Bedeutung. Mediert wird dieser Weg hauptsächlich durch die Transporter MRP3, MRP4 (multidrug resistance-associated protein) und OST α/β . Zusätzlich werden der Gallensäuremetabolismus und deren Entgiftung gesteigert, während die Synthese gehemmt wird (37,64,87).

Unter physiologischen Bedingungen sind diese alternativen Transportsysteme nur schwach ausgebildet, können aber bei Bedarf vermehrt exprimiert werden (77,88,89).

Damit die GS bei Cholestase über die Niere ausgeschieden werden können, wird einerseits die ASBT-vermittelte Rückresorption der GS gehemmt, damit diese nicht wieder in die Tubuluszellen aufgenommen werden und andererseits wird der Transport der GS über MRP2/4 aus den Zellen in das Tubuluslumen gefördert (37,64,87,90). Insgesamt führt dies bei cholestatischen Bedingungen zu einer kompensatorisch erhöhten renalen Elimination von GS, um so die Leberzellen vor der potentiellen Toxizität dieser zu schützen. Aber geschieht dies auf Kosten der Nierenepithelzellen (siehe Abbildung 11)?

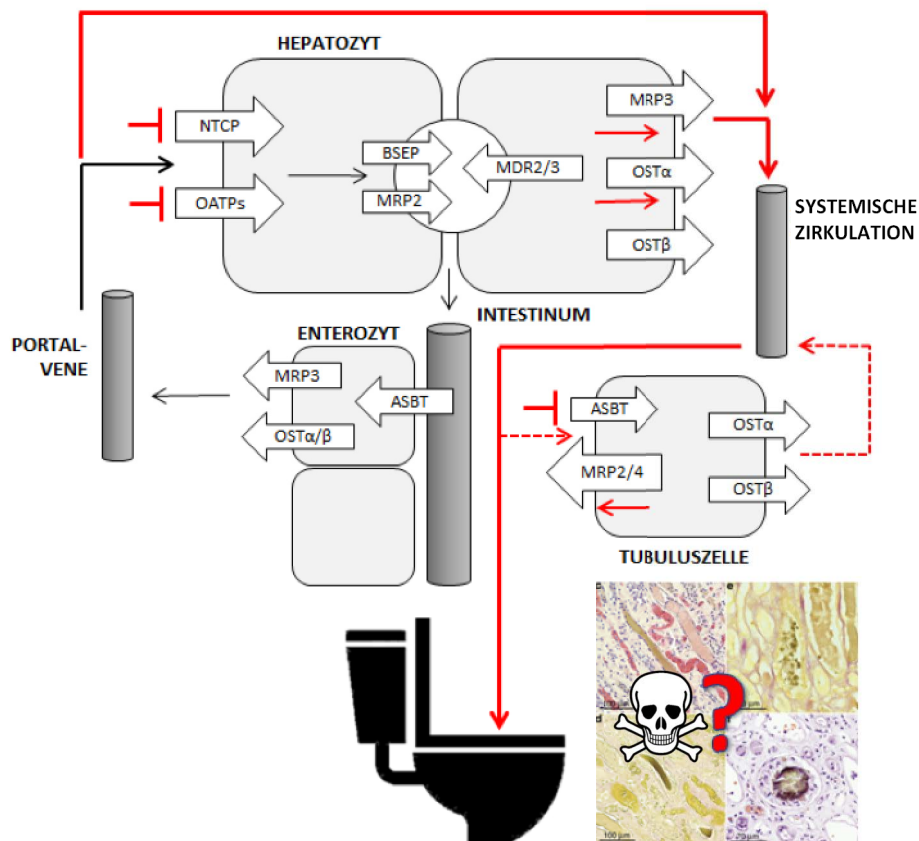


Abbildung 11: Kompensatorisch renale Elimination. Bei cholestatischen Bedingungen kommt es zu einer kompensatorisch renalen Elimination von GS. Dies geschieht zum einen indem die Aufnahme von GS in die Hepatozyten durch die Transporter NTCP und OATP gehemmt wird und zum anderen indem der Transport basolateral über MRP3 und OST α/β in die systemische Zirkulation gefördert wird. Damit die GS nicht wieder von den Tubuluszellen rückresorpiert werden, wird der Transporter ASBT blockiert und gleichzeitig werden die aufgenommenen GS über MRP2/4 aus der Tubuluszelle ausgeschleust. Insgesamt stellt dieser alternative Exkretionsweg einen Schutzmechanismus für die Leber und Gallengänge vor potentiell toxischen GS bei Cholestase dar.

1.3.11 Kernrezeptoren

Damit das Gleichgewicht zwischen Synthese, Aufnahme und Exkretion aufrechterhalten werden kann, bedarf es einer koordinierten Regulation der hepatobiliären Transporter. Kernrezeptoren spielen in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle. Bei cholestatischen Bedingungen hemmen sie mittels positiver und negativer Feedback-Mechanismen die Gallensäuresynthese und induzieren alternative Exkretionswege. Ihre Aktivierung erfolgt durch Bindung eines Liganden (z.B. Bilirubin, Gallensäuren). Nach Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Kernrezeptors, somit ist dieser in der Lage, an DNA zu binden und eine Transkription eines Gens zu hemmen oder zu induzieren (37).

Im Zusammenhang mit Cholestase ist vor allem der durch GS aktivierte Kernrezeptor und Transkriptionsfaktor Farnesoid X (FXR) zu erwähnen. Er führt einerseits über einen negativen Feedbackmechanismus zur Suppression des Enzyms 7 α -Hydroxylase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensäuresynthese, und zur Hemmung von NTCP, einem Gallensäure-Importer. Andererseits induziert er über die kanalikulären Transporter BSEP, MRP2 und MDR3 die apikale Sekretion der Gallensäuren und alternative Exkretionswege basolateral über OST α/β werden eröffnet (76,85). Bei Wiederaufnahme der Gallensäuren im Dünndarm aktiviert FXR den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 15 (19 beim Menschen; FGF 15/19), welcher wiederum zu einer Hemmung der Gallensäuresynthese führt (91).

Weitere Transkriptionsfaktoren wie CAR (constitutive androstane receptor), PXR (pregnane X receptor), VDR (vitamin D receptor) und PPAR α (peroxisome proliferated-activated receptor alpha) sind vor allem beim Vorgang der Detoxifikation von GS, Medikamenten und Xenobiotika von großer Wichtigkeit (69,85).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass nur hydrophobe GS, nicht aber hydrophile, die Fähigkeit besitzen, als Liganden zu fungieren. Da der GS-Pool der Maus aber hauptsächlich aus hydrophilen GS besteht, haben Ergebnisse aus Tiermodellen nicht automatisch dieselbe Relevanz für den Menschen (69).

1.4 Fragestellung, Hypothese und Ziele

Eine kürzlich publizierte Arbeit von Fickert, Krones et al. lieferte in einer experimentellen Studie an CBDL Mäusen wegweisende Hinweise, dass renal ausgeschiedene Gallensäuren, die eine zentrale pathophysiologische Rolle in der Entstehung der CN zu spielen scheinen, potentiell toxisch auf Sammelrohr- und Tubuluszellen wirken. Umgekehrt scheinen hydrophile Gallensäuren wie z.B. *norUDCA* zu einer Verbesserung des Phänotyps bei CN zu spielen (55). Bis dato wurde jedoch die Auswirkung von Gallensäuren auf die Viabilität renaler Sammelrohr- und Tubuluszellen *in vitro* nicht systematisch untersucht. Eine solche Untersuchung würde maßgeblich zur Entschlüsselung der pathogenetischen Schritte in der Entstehung der CN beitragen. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte von GS auf Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen.

Die Hypothesen lauteten wie folgt:

- GS stellen einen zentralen Trigger in der Pathogenese von strukturellen Nierenveränderungen bei fortgeschrittener Lebererkrankung dar. Die *in vitro* Inkubation von Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen mit potentiell toxischen GS führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Viabilität.
- Die hydrophile GS *norUDCA* führt *in vitro* zu keiner Abnahme der Viabilität von Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur - Allgemeines

Unter Zellkultur versteht man das Züchten von tierischen oder pflanzlichen Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus. Zellkulturen lassen sich anhand verschiedener Merkmale unterscheiden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der Primärkultur, bei der das Ausgangsmaterial Organe oder Gewebe verschiedener Spenderorganismen darstellt und der permanenten Zellkultur, bei der es sich um transformierte Zellen handelt. Diese Zellen können entweder direkt aus einem Tumor stammen oder aber es wurde ihr Phänotyp durch einen gentechnischen Eingriff *in vitro* erzeugt.

Wichtigstes Unterscheidungsmerkmal ist die Lebensdauer. Primärkulturen weisen noch viele Merkmale zu ihrem Ausgangsmaterial auf, sind aber nur begrenzt kultivierbar. Dauerkulturen hingegen können aufgrund eines transformierten Phänotyps nahezu unbegrenzt kultiviert werden, besitzen jedoch nur mehr wenige ihrer *in vivo* Charakteristika (92). Für unsere Versuche wurden ausschließlich permanente Zellkulturen verwendet.

2.1.1 MDCK-Zelllinie

MDCK (Madin-Darby canine kidney)-Zellen (ATCC® CCL-34™) wurden im Jahr 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby aus der Niere eines gesunden, weiblichen Cockerspaniels isoliert. Sie entstammen höchstwahrscheinlich dem distalen Tubulussystem (93). Diese Zelllinie gilt als etabliertes Modell für Versuche mit Epithelzellen, da sie eine klare apikal-basolaterale Zellpolarität, ein schnelles Zellwachstum und gut abgrenzbare tight-junctions aufweisen (94).

2.1.2 mIMCD-3-Zelllinie

Die mIMCD-3 (mouse inner medullary connecting duct)-Zelllinie (ATCC® CRL-2123™) ist eine mit dem Simian-Virus-40 (SV-40) transfizierte Zelllinie. Die Zellen wurden 1991 von Rauchman M. aus einem Sammelrohr der inneren Markregion einer transgenen Maus

isoliert. Es handelt sich dabei um polarisierte Zellen, welche viele Eigenschaften von Sammelrohrzellen aufweisen. Sie sind u.a. in der Lage Endothelin zu sezernieren, bilden tight-junctions aus und formen Tubuli (95).

2.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Kulturflaschen (75 cm²-Bodenfläche, Corning incorporated, New York, USA) im Kulturmedium mit 10 % FBS (fetal bovine serum/fötales Kälberserum; Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 5 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) im Brutschrank (RS Biotech Galaxy R) bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchte kultiviert.

Alle Arbeitsschritte wurden in einer sterilen Werkbank (Herasafe Kendro, Deutschland) durchgeführt. Alle Materialien und Geräte wurden, bevor sie zum Einsatz kamen, gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert und autoklaviert. Die Raumwerkbank wurde während der Ruhezeit mit UV-Licht bestrahlt. Wachstum und Morphologie der Zellen wurden mit einem Auflichtmikroskop (Olympus TH4-200) regelmäßig beobachtet.



Abbildung 12: Reinraumwerkbank (links) und Inkubator (rechts)

2.1.3.1 Zellerhalt

Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium je nach Zelldichte regelmäßig alle 2-3 Tage gewechselt. Der richtige Zeitpunkt wurde einerseits durch die Begutachtung der Zellen unter dem Mikroskop und andererseits anhand der Farbe des Mediums bestimmt. Je nach Verbrauchszustand hatte das Medium die Farbe dunkelrot bis gelb, wobei gelb stark verbrauchtes Medium anzeigte. Das verbrauchte Medium wurde mit einer 15 ml Stripette abgesaugt und in einem Glasbehälter aufgefangen und nach Autoklavierung entsorgt. Um die Zellen vor Austrocknung zu schützen, wurde etwas Medium zurückgelassen. Mit einer neuen 15 ml Stripette wurden die mIMCD3-Zellen mit PBS (Apotheke LKH – Univ.-Klinikum Graz, Österreich) gespült, MDCK-Zellen wurden nicht gespült. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und 14 ml frisches Medium, welches vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, hinzugefügt.

Als Zellkulturmedien wurden EMEM und DMEM verwendet.

EMEM (Gibco, Karlsruhe, Deutschland): Dieses für die MDCK-Zelllinie verwendete Medium ist ein standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur mit breiter Verwendbarkeit für humane und verschiedene tierische Zellen. Es stellt eine Modifikation des BME (engl.= basal medium Eagle), dem Mutter aller Basalmedien, dar.

Es enthält: 2 mM L-Glutamin
1 mM Natriumpyruvat
1500 mg/L Natriumbikarbonat

DMEM (Gibco, Karlsruhe, Deutschland): Dieses für die mIMCD3-Zelllinie verwendete Medium leitet sich ebenso vom BME (engl.= basal medium Eagle) ab. Zum EMEM unterscheidet es sich durch eine vielfach erhöhte Konzentration an Vitaminen und Aminosäuren. Es enthält als Grundlage Dulbeccos's modified Eagle's Medium.

Es enthält: 4500 mg/L Glukose
4 mM L-Glutamin
1 mM Natriumpyruvat
1500 mg/L Natriumbikarbonat

Die Grundmedien wurden supplementiert mit

10 % FBS (Fetales Kälberserum, aliquotiert gelagert bei -20°C)

5 % Penicillin/Streptomycin

Die Medien wurden steril filtriert (Corning incorporated, New York, USA) und dunkel im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert. Vor Verwendung wurden sie im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Da es bei erhöhter Zelldichte zum Absterben der Zellen kommen kann, war eine regelmäßige Subkultivierung der Zellen notwendig.

Subkultivierung von mIMCD3-Zellen

Nach ca. 7 Tagen zeigten die Zellen ein konfluentes Wachstum und wurden passagiert. Nach Absaugen des Mediums aus der Flask wurden 5 ml PBS zum Spülen der Zellen hinzugefügt, welches nach 2 Minuten Einwirkzeit wieder abgesaugt werden konnte. Danach wurden die Zellen mit 10-15 Tropfen Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin/0,02% EDTA [Gibco, Karlsruhe, Deutschland]) 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch das Trypsin wurden die Zellverbände gelöst und die Zellen lagen nun als Zellsuspension vor. Um die Reaktion zu stoppen wurden 4 ml Medium in die Flask mit den Zellen und dem Trypsin gegeben und anschließend wurden mittels einer Stripette nach wiederholtem Aufziehen und Ablassen die gelösten Zellen aufgenommen. 2-3 ml dieser Zellsuspension wurde in eine mit 14 ml Medium vorgelegte Flask ausgesät. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob genügend Zellen vorlagen.

Subkultivierung von MDCK-Zellen

Nach ca. 7 Tagen waren die MDCK-Zellen bereit, passagiert zu werden.

MDCK-Zellen wurden nicht mit PBS behandelt. Nach dem Absaugen des Mediums wurden 4 ml frisches Medium hinzugefügt und die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Flaskboden abgetragen. Danach konnten die Zellen mit einer Stripette aufgenommen werden und in eine neue Flask mit 14 ml Medium überführt werden. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob genügend Zellen vorlagen.

2.1.3.2 Kryokonservierung der Zellen

Um die Zellen für spätere Einsätze zu konservieren, wurden diese kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen (MDCK-Zellen wurden nicht mit PBS gewaschen). Anschließend wurden 10-15 Tropfen Trypsin hinzugefügt und bei 37°C für maximal 5 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen in 4 ml Medium aufgenommen und in ein Falcon mit 10 ml Medium überführt und 3 Minuten bei 800 rpm (rounds per minute) zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3). Der Überstand wurde dekantiert und das übriggebliebene Zellpellet wurde mit 10 ml eines Medium-Dimethylsulfoxid-Gemisches suspendiert (9 ml Medium + 1 ml DMSO). Dimethylsulfoxid (DMSO [Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland]) wirkt als Frostschutzmittel, da es die Bildung von Eiskristallen und somit die Zerstörung der Zellmembran durch Eiskristalle verhindert. Die Zellen wurden in Portionen von 1 ml in vorher beschriftete Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für anschließend mindestens 24 Stunden bei -80°C in einem Freezing Container zwischengekühlt bevor sie in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerkonserviert werden konnten.

Beim Prozess der Kryokonservierung ist die Abkühlgeschwindigkeit von großer Wichtigkeit. Zu schnelles Abkühlen führt zu Schäden aufgrund intrazellulärer Eiskristallbildung und zu langsames Abkühlen führt zu Schäden aufgrund von zu stark konzentrierten Elektrolyten (92).

2.1.3.3 Auftauen der Zellen

Die kryokonservierten Zellen aus dem Stickstofftank wurden im Wasserbad unter Schwenken aufgetaut und anschließend in ein Reagenzröhrchen mit 10 ml Medium überführt und 3 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Kulturgefäß mit 10 ml Medium überführt. Der gesamte Prozess des Auftauens erfolgte möglichst rasch, da die kryoprotektive Substanz DMSO bei höheren Temperaturen eine zellschädigende Wirkung entwickelt.

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Kultivierung der Zellen in 24-Well-Platten

Für die Versuche wurden die Zellen in 24-Well-Platten (Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Eine Kammer der 24-Well-Platte wurde mit 900 µl Medium und 100 µl Zellsuspension befüllt. Die Platten wurden ca. 48 Stunden im Brutschrank gehalten bis die Zellen ein konfluentes Wachstum aufwiesen und bereit für einen Versuch waren.

Die Zellen wurden mit den Gallensäuren CA, CDCA, TCA, TCDCA, *nor*UDCA in Konzentrationen von 50 µM-3 mM und Serum von CBDL-Mäusen (common-bile duct ligation, Gallengangsligatur) über 3-24 Stunden behandelt.

Das Serum war kryokonserviert und stammte von 6 Wochen gallengangsligierten Mäusen (C57BL/6, Tierzucht Himberg, Wien). Im Rahmen dieser Diplomarbeit waren keine weiteren Tierversuche notwendig.

Bezeichnung	Molekulargewicht	Produktnr.	Hersteller
Cholsäure	430,55 g/mol	C1254	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Taurocholsäure	537,70 g/mol	T9034	
Chenodeoxycholsäure	414,55 g/mol	C8261-1G	
Taurochenodeoxycholsäure	521,69 g/mol	T6260	
<i>nor</i> Ursodeoxycholsäure	416,64 g/mol	10702991	

Tabelle 2: Verwendete Gallensäuren

2.2.2 Herstellung der Stocks

Die Gallensäuren wurden in sterilem Wasser (Aqua bidest, Fresenius) gelöst, aliquotiert und im Tiefkühlschrank bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden diese im Wasserbad erwärmt.

2.2.3 Herstellung der Verdünnungsreihen

Um spätere Verwechslungen der Gallensäuren in den verschiedenen Konzentrationen zu vermeiden, wurden vorab die benötigten Falcontubes genau beschriftet. Je nach gewünschtem Verhältnis wurde der entsprechende Anteil an Kulturmedium und Stocksolution in ein Falcontube pipettiert (genauer Mengenanteil siehe Anhang). Um eine homogene Vermengung zwischen Medium und Stocksolution zu gewährleisten, wurden alle Falcontubes geschüttelt.

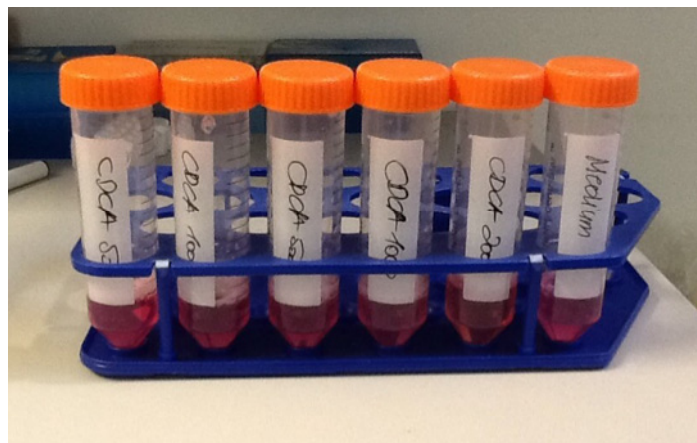


Abbildung 13: Verdünnungsreihe

2.2.4 Treatment der Zellen mit Gallensäuren und ikterischem Serum

Das Medium wurde vorsichtig aus allen Kammern mit einer Pipette abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Danach wurde jeweils 1 ml der jeweiligen Testsubstanz in die gewünschte Kammer pipettiert. Um die Zellen nicht zu verletzen, war es beim Pipettieren wichtig, die Pipettenspitze vorsichtig am Rand der Kammern anzusetzen und den Inhalt der Pipette nicht zu fest abzulassen. Pro Gallensäure und pro Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung angefertigt.

Für jede Testsubstanz wurde eine frische Pipettenspitze verwendet. Zu Gunsten späterer Rekonstruierbarkeit und um Fehler während der Durchführung der Experimente zu vermeiden, wurden vorab Pläne angefertigt, nach deren Reihenfolge die Behandlung der Zellen erfolgte. Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau 3 bis 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Negativkontrolle wurde mit Medium ohne Gallensäuren

durchgeführt. Die Positivkontrolle mittels Ethanol 70 % wurde erst nach Ablauf der Inkubationszeit durchgeführt um eine falsch niedrige Viabilität der Zellen durch eventuelles Vaporisieren des Ethanols innerhalb der Well-Platten auszuschließen.

2.3 Vitalitätstest

Die Viabilität stellte die Hauptzielgröße dar und wurde mittels des MTT-Assays erbracht. Das Prinzip beruht darauf, dass nur in Zellen mit aktiver Stoffwechselaktivität, also grob nur in lebenden Zellen, das wasserlösliche, schwach gelbliche 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid (**MTT**) aufgenommen werden und zum dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazan umgewandelt werden kann (siehe Abbildung 14).

Der genaue zelluläre Mechanismus der Reduktion von MTT zu Formazan ist nicht gut verstanden. Hingegen der weitläufigen Annahme, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen seien für die Reaktion verantwortlich, scheinen jedoch vielmehr die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Hydrat (NADH) und NADPH eine Schlüsselposition dabei einzunehmen und Succinat scheint nur in geringem Ausmaß dafür verantwortlich zu sein (96,97).

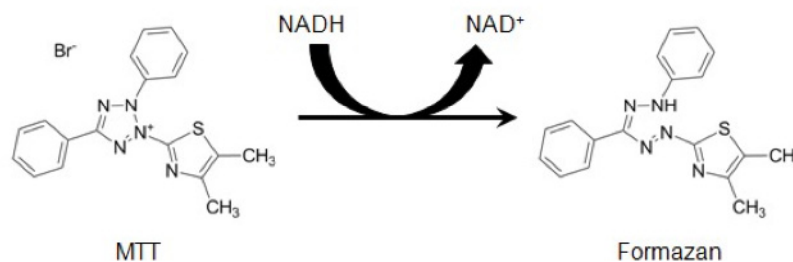


Abbildung 14: Reaktion von Tetrazoliumbromid zu Formazan (97). Tetrazoliumbromid wird zu Formazan reduziert, welches in einem stark blauen Farbstoff erscheint.

Die Umwandlung von MTT in Formazan spiegelt daher nicht die Zellatmung, sondern vielmehr die Glykolyserate wider und wird nicht, wie ursprünglich angenommen, durch die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen beeinflusst, sondern größtenteils durch Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (98).

Die Menge an gebildeten Formazan wird über die optische Dichte bei 550 nm gemessen und somit kann auf die Viabilität der Zellen rückgeschlossen werden.

Die Stärke der Umwandlung von MTT in Formazan ist von folgenden Faktoren abhängig:

- Konzentration an MTT
- Inkubationszeit
- Anzahl an lebenden Zellen
- metabolische Aktivität der Zellen (92)

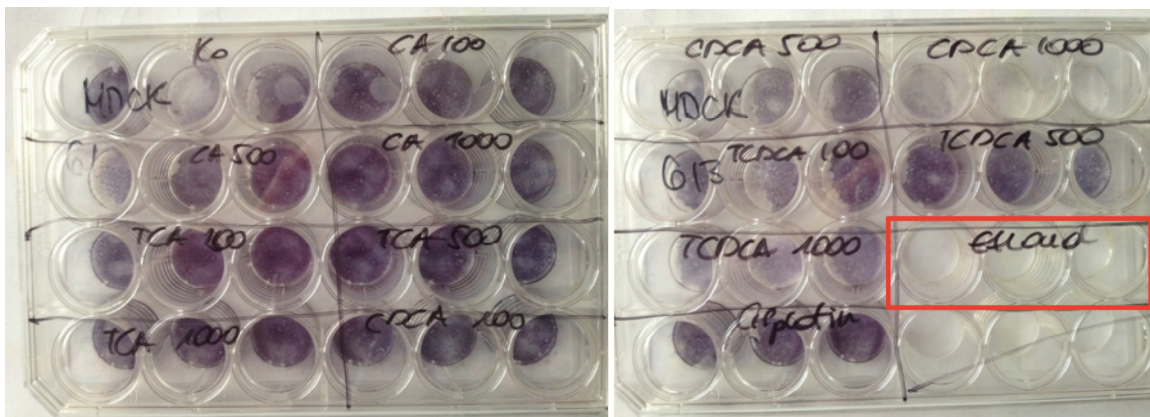


Abbildung 15: 24-Well Platten nach Inkubation mit MTT-Lösung. Je stärker der Farbumschlag d.h. desto dunkelblauer die Färbung, desto höher die Viabilität. Sehr gut erkennbar ist dies am Beispiel von Ethanol (re. im Bild; roter Rahmen), welcher sehr toxisch auf die Zellen wirkt. Erwartungsgemäß kommt es hier zu keinerlei Anfärbung der Zellen.

2.3.1 Durchführung des MTT-Assays

Das MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) wurde in Medium ohne Phenolrot (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und mit einem 0,2 µL Filter steril filtriert.

Nach Absaugen des Mediums aus allen Kammern der 24-Well-Platten und zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit 300 µl der MTT-Lösung für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig abpipettiert. Für die photometrische Messung musste nun der blaue Farbstoff mittels eines 10:1 Gemisches aus Isopropanol/Salzsäure (400 µl pro Well) aus den Zellen gelöst werden. Nach einer 10-minütigen Schüttelphase wurde der Inhalt eines Wells auf 3 Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) aufgeteilt und mit einem Spektrometer

(SPECTROstar Omega) photometrisch bei 550 nm vermessen. Die Kontrollgruppe wurde mit Isopropanol durchgeführt.

2.4 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie benützt die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen zur präzisen Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene. Dabei wird ein spezifischer Antikörper dem zu untersuchenden Gewebe/Zellen eingesetzt. Dieser Antikörper bindet nun spezifisch am Epitop eines zu untersuchenden Antigens. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt um diese Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar zu machen. Dies geschieht entweder direkt, indem der primäre Antikörper mit einem sogenannten Markermolekül (z.B. fluoreszierender Farbstoff, Enzym, kolloidales Gold) gekoppelt ist oder indirekt, indem ein gegen den primären Antikörper gerichteter sekundärer Antikörper eingesetzt wird, welcher dieses Markermolekül trägt. Mittels der indirekten Methode kann ein schwaches primäres Signal verstärkt werden.

2.4.1 Caspase-3 Nachweis

Caspasen (Cysteinyll-Aspartat-spezifische Proteasen) sind eine Familie von wichtigen Signalmolekülen, welche maßgeblich am Prozess der Apoptose (programmierter Zelltod) beteiligt sind.

Sie werden in 3 Subtypen mit verschiedenen Aufgaben eingeteilt:

- Proinflammatorische Caspasen
- Initiator-Caspasen
- Effektor-Caspasen

Caspase 3 zählt zu den Effektorcaspasen, welche von Initiatorcaspasen (Caspase 2,8,9 und 10) in ihre aktive Form geschnitten wird.

Mittels des Caspase-3-Nachweises können apoptotische Zellen immunhistochemisch dargestellt werden.

2.4.1.1 Methodenprinzip

Nachdem die Zellen gemäß dem Protokoll kultiviert wurden und ein konfluentes Wachstum zeigten, konnten Sie für die Immunfluoreszenz verwendet werden. 2 ml Zellsuspension wurde auf Chamberslides in einer Verdünnung von 1:20 (mit PBS) aufgetragen und für ca. 72 Stunden kultiviert. Gemäß dem Protokoll wurden die Zellen dann mit CDCA in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert.

Die nachfolgende Immunfluoreszenz erfolgte gemäß einem festgelegten Protokoll.

Nach Absaugen des Mediums und nach 3-maligem Spülen mit PBS wurde zum Fixieren der Zellen Aceton bei -20°C verwendet. Die Reihenfolge der Inkubation mit den Antikörpern wurde wie folgt durchgeführt:

- 1) Nach erneutem 3-maligen Spülen erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper
- 2) 3-maliges Spülen mit PBS
- 3) Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Von nun an mussten die Slides vor Licht geschützt werden
- 4) 3-maliges Spülen mit PBS, 1-maliges Spülen mit destilliertem Wasser
- 5) Eindecken mit *Mounting-Medium* (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Die Auswertung der Proben erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Olympus Invers IX51).

Primärantikörper	Firma, Bestellnummer	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-Caspase 3	R&D Systems, AF835	1:20	60 min.
Sekundärantikörper	Firma, Bestellnummer	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti rabbit Alexa Fluor™ 488 grün	Thermo Fisher, A11006	1:100	30 min.
Anti-mouse Alexa Fluor™ 594 rot	Thermo Fisher, A11037	1:50	30 min.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

2.5 Auswertung der durchgeführten Experimente

Hauptzielgröße dieser Arbeit stellte die Viabilität dar, welche mittels des MTT-Assays erhoben wurde. Die Viabilität spiegelt die Vitalität der Zellen wider und leitet sich von der metabolischen Aktivität der Zellen ab. Grob gesagt gilt, je höher der Anteil an lebenden Zellen ist, desto ausgeprägter ist deren metabolische Aktivität *ergo* Viabilität.

Die aus dem MTT-Assay gewonnenen Daten wurden computergestützt in Microsoft Excel verwertet. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (STABWA) dargestellt. Alle getesteten Substanzen wurden in Relation zur Positivkontrolle (Viabilität 100 %) gesetzt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Statistik- und Analysesoftware IBM SPSS (Version 22). Die Gruppen wurden untereinander auf ihre Signifikanz mittels einfaktorieller ANOVA und der Post-hoc-Tests nach Bonferroni und Scheffé getestet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant und einer $\leq 0,001$ als hoch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den MTT-Assays vorgestellt, grafisch dargestellt und erläutert.

Die verschiedenen Testsubstanzen beziehen sich immer auf die Negativkontrolle mit Medium, welche mit 100 % Viabilität angenommen wurde.

Für den Signifikanzwert p gilt: signifikant (*) wenn $p \leq 0,05$ und hoch signifikant (**) wenn $p \leq 0,001$. Diese Erläuterung gilt für alle nachfolgenden Abbildungen und Diagramme.

3.2 Wirkung von CA auf mIMCD-3-Zellen

Nach Kultivierung und anschließender Inkubation für 3, 6, 12 und 24 Stunden mit der Gallensäure CA wurde die Viabilität der mIMCD-3-Zellen mit dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT) Assay erhoben.

Insgesamt wurden 3 voneinander unabhängige Versuchsreihen über 24 Stunden und jeweils eine über 3, 6 und 12 Stunden mit Konzentrationen von 100 μM , 500 μM , 1000 μM , 2000 μM und 3000 μM durchgeführt.

Bei der 24-stündigen Inkubation der mIMCD-3-Zellen mit den Konzentrationen 500 μM , 1000 μM , 2000 μM und 3000 μM ergab sich folgendes Bild (siehe Abbildung 16). Es kam in keinem der Durchgänge zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Viabilität. Auch bei Dosisescalationen von bis zu 3000 μM konnte keine Abnahme der Viabilität detektiert werden.

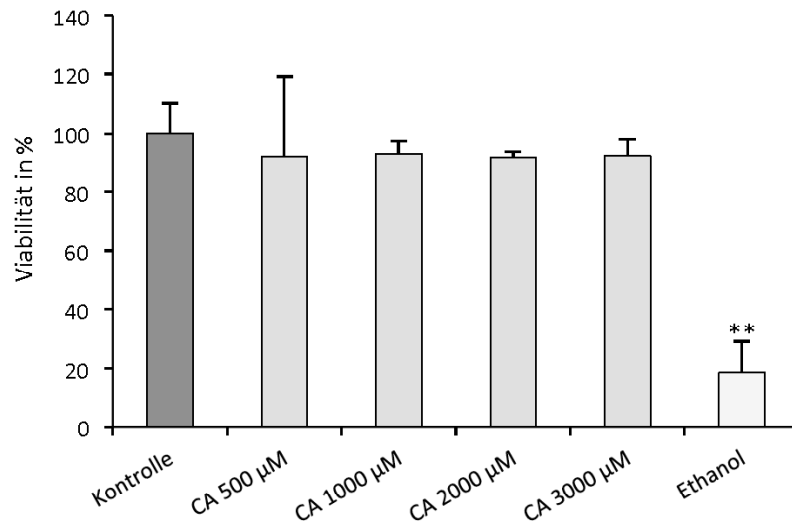


Abbildung 16 – Diagramm: Wirkung von CA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h. Nach Kultivierung und anschließend 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an CA wurde die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays erbracht. Auch bei Dosisescalationen von bis zu 3000 µM kam es zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Viabilität.

3.3 Wirkung von CA auf MDCK-Zellen

Bei der Inkubation der MDCK-Zellen über 24 Stunden mit CA in den Konzentrationen 100 µM, 500 µM, 1000 µM und 2000 µM zeigte sich keine Abnahme der Viabilität; im Gegenteil, die Viabilität zeigte sogar die Tendenz zur Zunahme (siehe Abbildung 17).

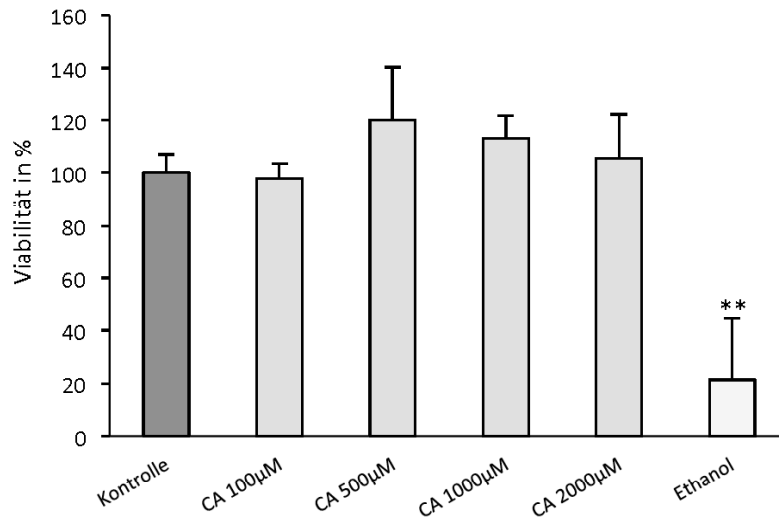


Abbildung 17 – Diagramm: Wirkung von CA auf MDCK-Zellen nach 24h. Es kam bei keiner Konzentration zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität.

3.4 Wirkung von TCA auf mIMCD-3-Zellen

Die Zellen der mIMCD-3-Zelllinie wurden in jeweils einem Durchgang für 3, 6 und 12 Stunden und in insgesamt 5 voneinander unabhängigen Durchgängen für 24 Stunden mit den Konzentrationen 100 μM , 500 μM , 1000 μM , 2000 μM und 3000 μM inkubiert. Bei Inkubation über 3, 6 und 12 Stunden konnte keine Veränderung der Viabilität beobachtet werden. In der Mehrzahl der Durchgänge über 24 Stunden (3 von 5) kam es, auch bei Dosisescalationen von bis zu 3 mM, zu keiner signifikanten Abnahme der Viabilität (siehe Abbildung 18).

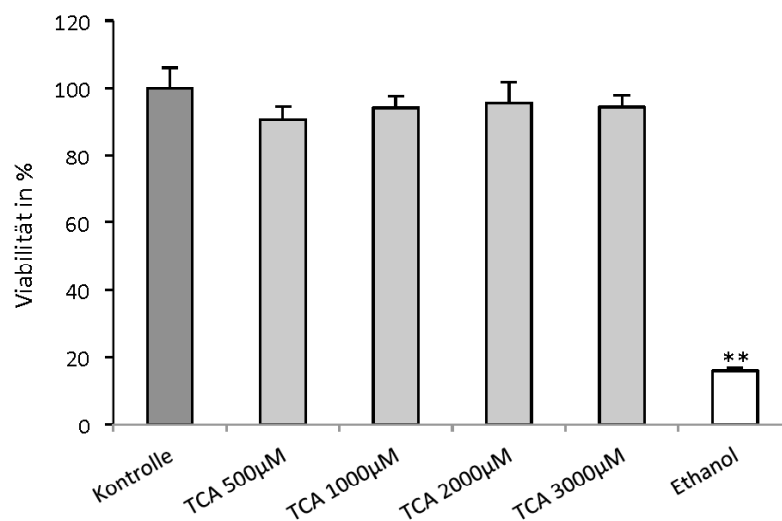


Abbildung 18 – Diagramm: Wirkung von TCA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h. Auch Dosisescalationen von 3 mM führten zu keiner nachweisbaren Abnahme der Viabilität.

3.5 Wirkung von TCA auf MDCK-Zellen

Bei der Inkubation der MDCK-Zellen mit TCA über 24 Stunden zeigte sich eine leichte Abnahme der Viabilität ($p \leq 0,05$); allerdings erst bei einer sehr hohen Konzentration von 2000 μM (siehe Abbildung 19).

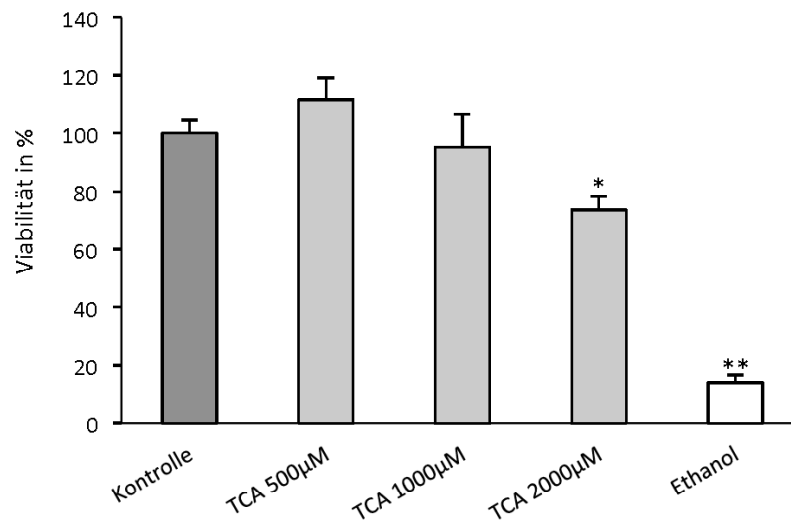


Abbildung 19 - Diagramm: Wirkung von TCA auf MDCK-Zellen nach 24h. Erst ab einer Konzentration von 2000 µM zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der Viabilität ($p \leq 0,05$).

3.6 Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen

Nach Kultivierung wurden die mIMCD-3-Zellen mit der Gallensäure TCDCA in folgenden Konzentrationen inkubiert: 100 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM. Untersucht wurde die Viabilität nach 3, 6, 12 Stunden (jeweils 1 Versuch) und 24 Stunden (3 voneinander unabhängige Versuchsreihen).

Bei der 3-stündigen bzw. 6-stündigen Inkubation mit den Konzentrationen 100 µM, 500 µM und 1000 µM kam es zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Viabilität (siehe Abbildung 20).

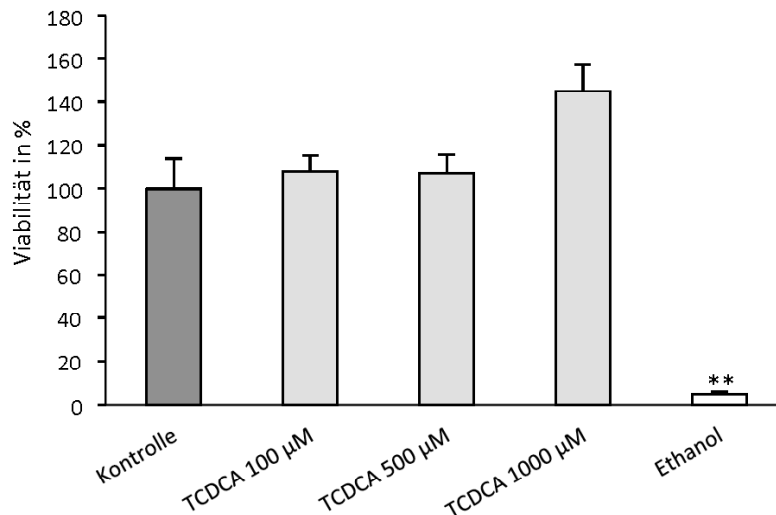


Abbildung 20 – Diagramm: Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 6h: Nach 6-stündiger Inkubation mit TCDCA in Konzentrationen von 100 µM bis 1000 µM kam es zu keiner Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen.

Bei einer Inkubationsdauer von 12 Stunden und einer Konzentration von 1000 µM zeigte sich eine erste signifikante Abnahme der Viabilität (siehe Abbildung 21). Der Messwert der Viabilität bei 1000 µM unterschied sich signifikant von dem Messwert der Negativkontrolle mittels Medium ($p \leq 0,001$).

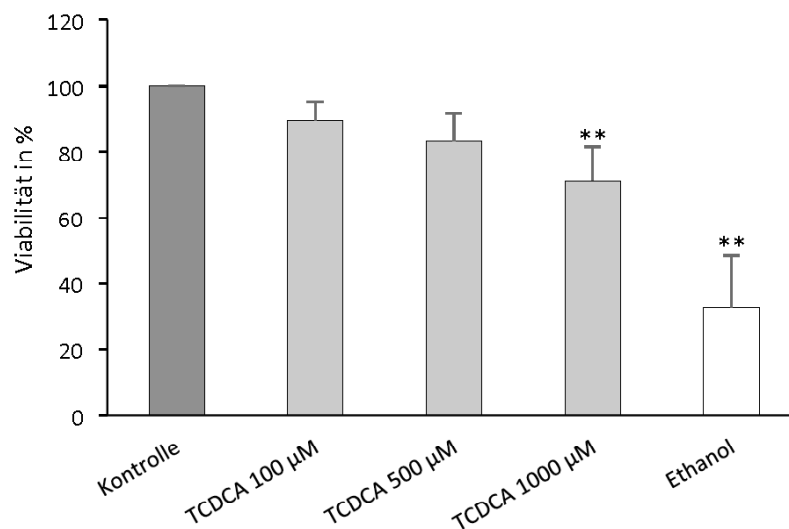


Abbildung 21 – Diagramm: Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 12h. Bei der Inkubation der mIMDC-3-Zelllinie über 12 Stunden kam es zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Viabilität ($p \leq 0,001$).

Der konzentrationsabhängige Effekt nahm bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden weiter signifikant zu. TCDCA 100 μM , 500 μM und 1000 μM unterschieden sich hoch signifikant von der Negativkontrolle ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung 22).

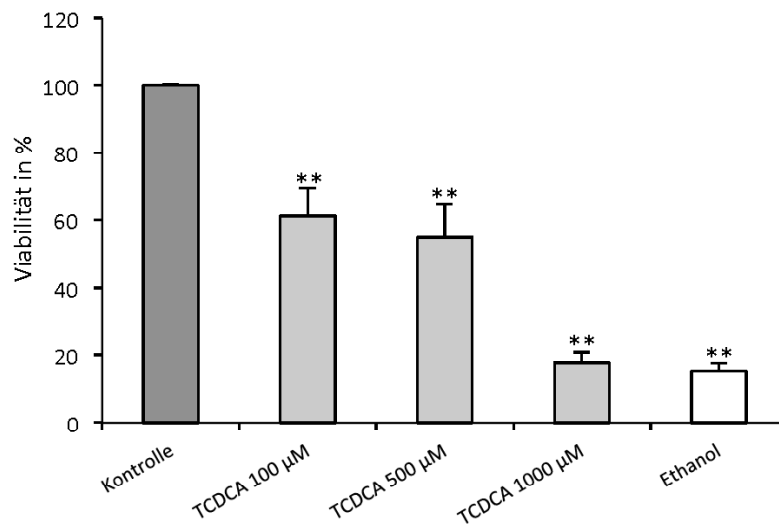


Abbildung 22 – Diagramm: Wirkung von TCDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h. Eine statistisch signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität konnte bei Inkubation der Zellen mit TCDCA in den Konzentrationen 100 μM ($p \leq 0,001$), 500 μM ($p \leq 0,001$) und 1000 μM ($p \leq 0,001$) nachgewiesen werden.

3.7 Wirkung von TCDCA auf MDCK-Zellen

Bei der Inkubation von MDCK-Zellen mit TCDCA über 24 Stunden zeigte sich in beiden durchgeführten Versuchsdurchgängen ein ähnliches Bild wie schon bei den mIMCD-3-Zellen beobachtet wurde. Es konnte bei beiden Versuchen eine statistisch signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität beobachtet werden (siehe Abbildung 23).

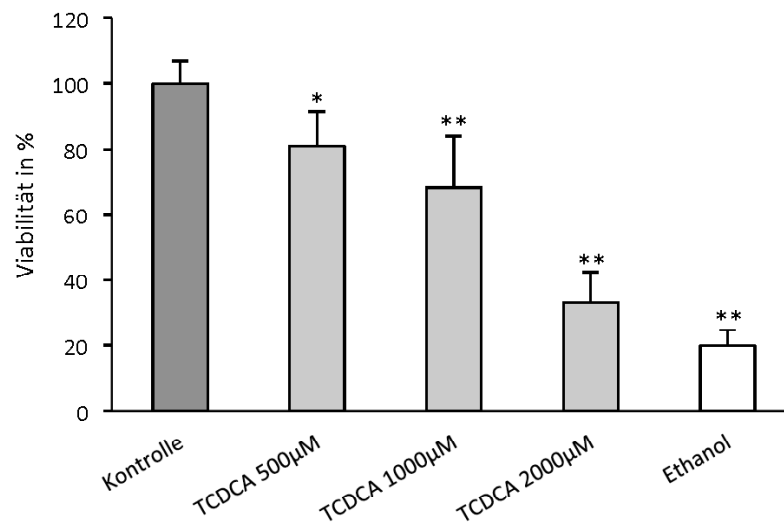


Abbildung 23 – Diagramm: Wirkung von TCDCa auf MDCK-Zellen nach 24h. Bei den Konzentrationen 500 µM ($p \leq 0,05$), 1000 µM ($p \leq 0,001$) und 2000 ($p \leq 0,001$) konnte jeweils eine signifikante Abnahme der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

3.8 Wirkung von CDCA auf mIMCD3-Zellen

CDCA wurde für 3, 6, 12, und 24 Stunden in Konzentrationen von 100 µM bis 2000 µM auf mIMCD-3-Zellen getestet. Eine Abnahme der Viabilität konnte bereits bei einer Inkubationszeit von 3 Stunden und einer Konzentration von 500 bzw. 1000 µM beobachtet werden (siehe Abbildung 24).

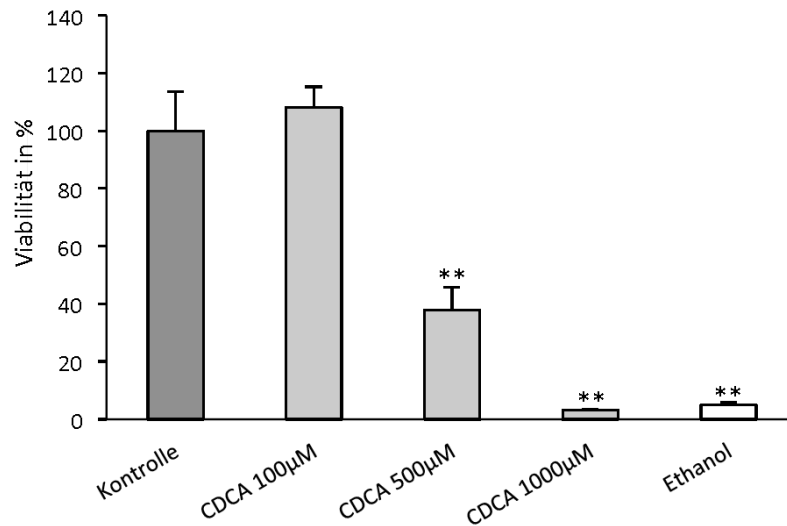


Abbildung 24 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 3h. Schon nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden konnte bei einer Konzentration von 500 µM ($p \leq 0,001$) und 1000 µM ($p \leq 0,001$) eine signifikante Abnahme der Viabilität beobachtet werden.

Ab einer Konzentration von 500 µM bis 1000 µM und einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde regelmäßig eine signifikante Abnahme der Viabilität beobachtet (siehe Abbildung 25). Für CDCA kann somit ein eindeutiger zeit- und konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden.

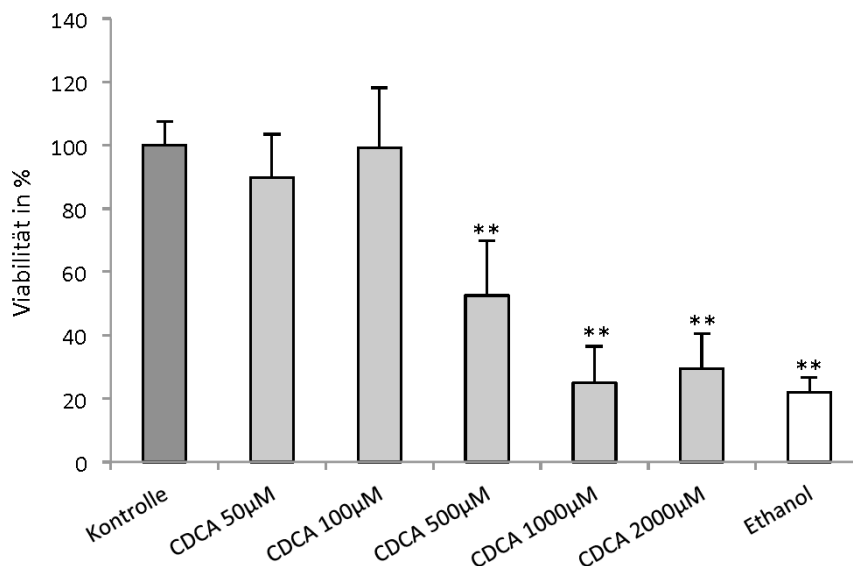


Abbildung 25 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf mIMCD-3-Zellen nach 24h. Eine signifikante Abnahme der Viabilität war ab einer Konzentration von 500 µM ($p \leq 0,001$) nachweisbar.

3.9 Wirkung von CDCA auf MDCK-Zellen

Die MDCK-Zellen zeigten bei einer Konzentration von 1000 μM bereits nach 3 Stunden eine erniedrigte Viabilität ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung 26).

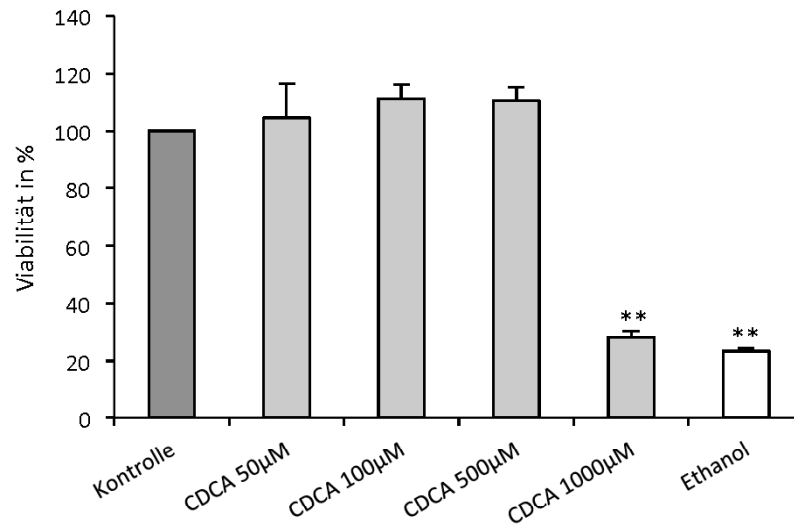


Abbildung 26 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf MDCK-Zellen nach 3h. Erste statistisch signifikante zytotoxische Effekte zeigten sich bereits nach 3 Stunden bei einer Konzentration von 1000 μM ($p \leq 0,001$).

Die Viabilität nahm erwartungsgemäß konzentrations –und zeitabhängig noch weiter ab. Bei einer Konzentration von 2000 μM lag die metabolische Aktivität der Zellen sogar unter der Viabilität der Positivkontrolle mit Ethanol (siehe Abbildung 27).

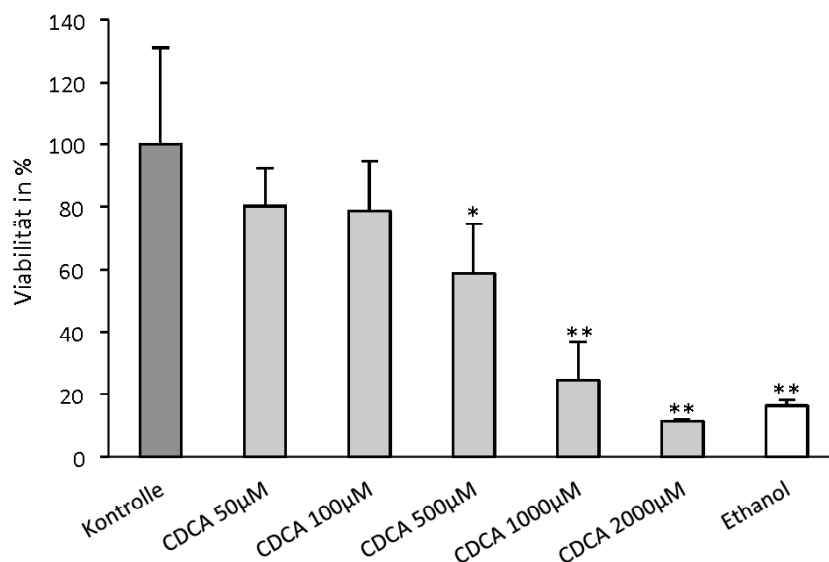


Abbildung 27 – Diagramm: Wirkung von CDCA auf MDCK nach 24h. Ein statistisch signifikanter konzentrationsabhängiger Effekt war ab einer Konzentration von 500 µM ($p \leq 0,05$) nachweisbar.

3.10 Wirkung von *norUDCA* auf mIMCD-3-Zellen

Die Inkubation der mIMCD-3-Zelllinie mit *norUDCA* über 24 Stunden mit Konzentrationen von bis zu 3000 µM führte zu keinerlei Abnahme der Viabilität der Zellen (siehe Abbildung 28).

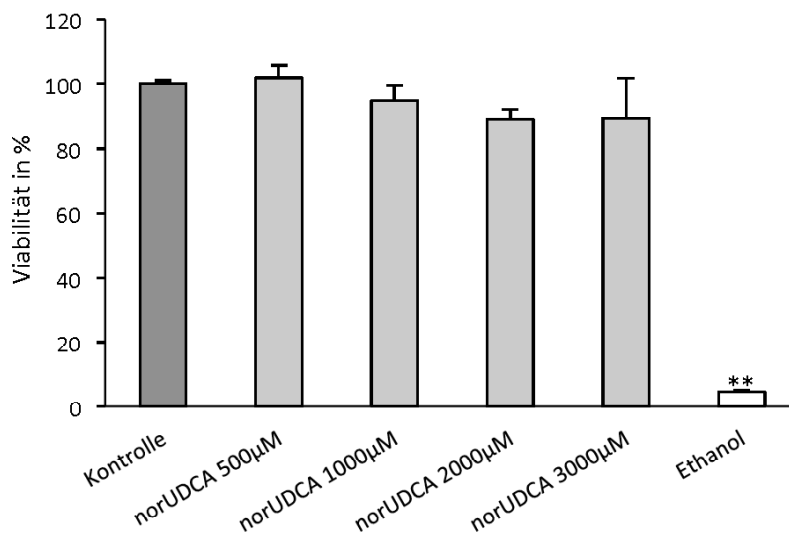


Abbildung 28 - Diagramm: Wirkung von *norUDCA* auf mIMCD-3-Zellen nach 24h. Für *norUDCA* wurde auch bei sehr hohen Dosen von 3 mM keine Abnahme der Viabilität beobachtet.

3.11 Wirkung von *norUDCA* auf MDCK-Zellen

Auch bei Behandlung der MDCK-Zelllinie mit *norUDCA* über 24 Stunden zeigte sich keine signifikante Abnahme der Viabilität (siehe Abbildung 29).

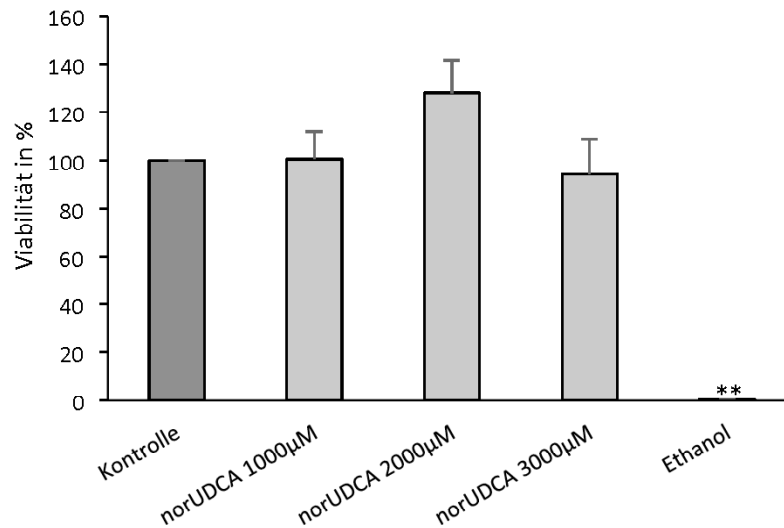


Abbildung 29 - Diagramm: Wirkung von *norUDCA* auf MDCK-Zellen nach 24h. Auch die Behandlung der MDCK-Zellen mit *norUDCA* zeigte keinerlei Abnahme der Viabilität.

3.12 Wirkung von ikterischem Serum auf mIMCD-3-Zellen

Die Inkubation von MDCK-Zellen mit ikterischem Serum von 6 Wochen CBDL-Mäusen in den Verhältnissen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 zeigte weder nach 12 Stunden noch nach 24 Stunden Inkubationsdauer eine Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen, weder im Vergleich zum Serum von scheinoperierten (Sham) Mäusen, noch zur Negativkontrolle mittels Medium (siehe Abbildung 30).

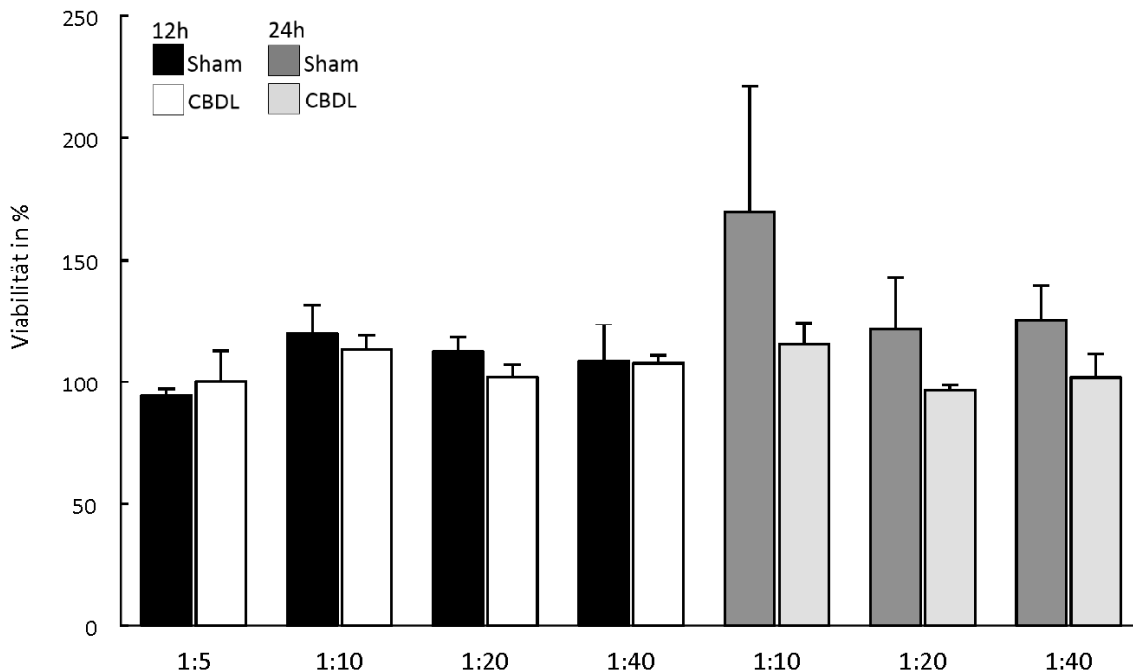


Abbildung 30 - Diagramm: Wirkung von ikterischem Serum auf MDCK-Zellen nach 12h und 24h. Es zeigten sich weder nach 12 Stunden noch nach 24 Stunden zytotoxische Effekte bei der Behandlung der Zellen mit ikterischem Serum von 6 Wochen CBDL Mäusen.

3.13 Caspase-3-Nachweis

Der Nachweis der Aktivierung der Apoptosekaskade erfolgte mittels eines Caspase-3 Antikörpers. Unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung erschienen Zellkerne blau und Caspase-3 in fluoreszierendem Grün.

Die Beurteilung erfolgte allerdings nur rein durch optisches Vergleichen der Objektträger untereinander unter dem Fluoreszenzmikroskop und wurde nicht quantitativ erfasst. Rein optisch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle (siehe Abbildung 31, Reihe oben) und der Zellen nach der Behandlung mit CDCA (siehe Abbildung 31, Reihe unten) nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden quantitativen Auswertung und aufgrund fehlender Wiederholungen, kann bezüglich Caspase-3 Aktivität keine verlässliche Aussage getroffen werden.

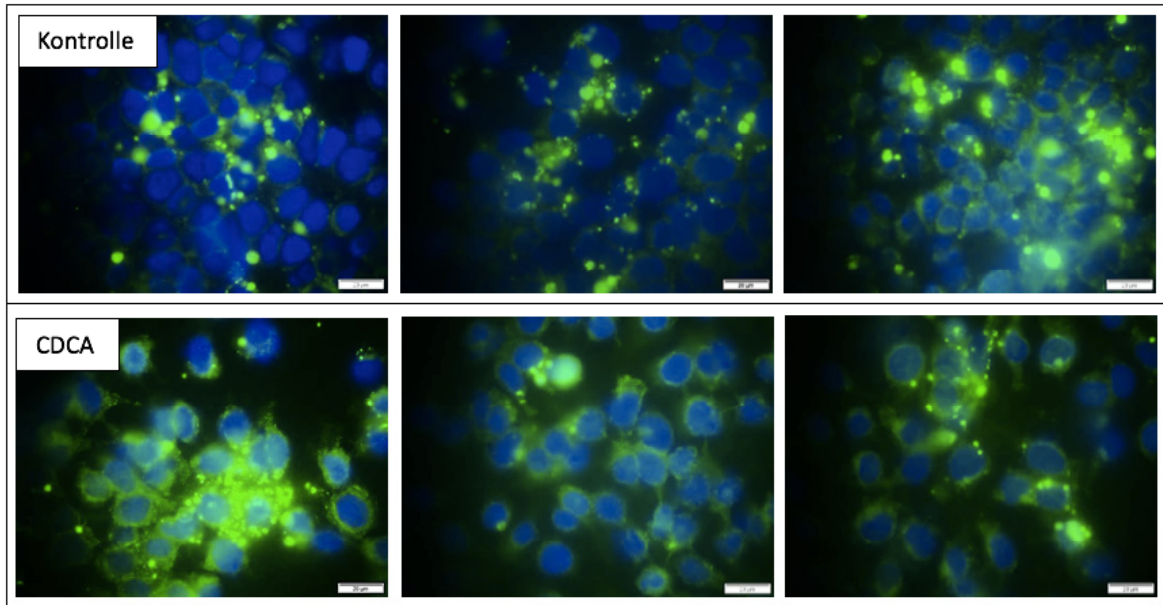


Abbildung 31: Caspase-3 Nachweis. Zellkerne in blau fluoreszierend, Caspase-3 in grün fluoreszierend. Zwischen der Kontrolle (oben) und der Behandlung mit CDCA (unten) konnte rein visuell kein eindeutig erfassbarer Unterschied detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von diversen Gallensäuren auf Sammelrohr- und Tubulusepithelzellen hinsichtlich deren Viabilität zu untersuchen. Dies ist insofern von Relevanz, da eine von Fickert, Krones et al. veröffentlichte Studie, Gallensäuren in den Fokus der Pathogenese von Tubulusepithelschäden bei schweren cholestatischen Lebererkrankungen rückt. Bisher wurden noch keine Studien veröffentlicht, in denen der Effekt von verschiedenen Gallensäuren im Zellversuch auf Nierenepithelzellen untersucht wurde.

Obwohl es eindeutige Hinweise auf das Vorkommen der CN gibt, und diese im Verdacht steht, bei prädisponierten PatientInnen eine renale Dysfunktion auszulösen (17,24,33,54,59), wird die CN dennoch von der modernen Literatur vernachlässigt behandelt. Es besteht daher ein dringender Anlass zur Klärung der Rolle von GS in der Pathogenese von strukturellen Nierenschädigungen bei cholestatischen Erkrankungen.

Bei der Behandlung der Zellen mit CA konnte bei keinem einzigen Versuchsdurchgang eine Abnahme der Viabilität, weder bei der MDCK- noch bei der mIMCD-3-Zelllinie, beobachtet werden. Aufgrund dieser eindeutigen Ergebnisse kann eine fehlende zytotoxische Wirkung von CA *in vitro* auf Sammelrohr- und Tubulusepithelzellen angenommen werden. Obwohl unkonjugierte GS allgemein als toxischer gelten, weil sie ungehindert in Zellen diffundieren können und keinen entsprechenden Transporter benötigen, blieb im Falle von CA eine zytotoxische Wirkung aufgrund ihrer hydrophilen chemischen Struktur aus (63,69). Testungen von CA auf Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen, jeweils von Ratten, bestätigen diese Ergebnisse (99,100).

Bei der Behandlung der Zellen mit CDCA kam es hingegen schon bei einer Inkubationszeit von drei Stunden und einer Konzentration von 500 μM zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Viabilität. Bei längeren Inkubationszeiten bewirkte bereits eine Konzentration von 100 μM eine Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen. Die Inkubation der Zellen mit CDCA führte zu den am stärksten ausgeprägten Abnahmen der

Viabilität der Zellen. Die ausgeprägte zytotoxische Wirkung ist auf die chemische Struktur von CDCA zurückzuführen. Sie zählt zu den unkonjugierten GS, und verfügt im Vergleich zu CA nur über zwei OH-Gruppen. Damit weist sie einen weitaus hydrophoberen Charakter auf als CA.

Die Behandlung der Zellen mit dem Taurinkonjugat von CDCA zeigte zwar eine eindeutige zytotoxische Wirkung, aber aufgrund der Konjugation mit Taurin war die Zytotoxizität nicht so stark ausgeprägt wie bei der unkonjugierten GS CDCA. Testungen an Hepatozyten von Ratten bestätigen die Abhängigkeit der Zytotoxizität vom Konjugationszustand der GS (101).

Die Ergebnisse der Behandlung der Zellen mit TCA waren nicht ganz eindeutig, was die Interpretation erschwert. Bei der Inkubation von mIMCD-3-Zellen mit einer sehr hohen Konzentration von 3 mM war keine Abnahme der Viabilität erkennbar. Es konnte aber in einigen Durchgängen eine signifikante Abnahme der Viabilität sowohl bei MDCK- also auch bei mIMCD-3-Zellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen traten aber nur bei der Behandlung mit sehr hohen Konzentrationen von mindestens 2 mM auf. Grundsätzlich gilt TCA im Zellversuch an Hepatozyten als nicht zytotoxisch (101).

Bei Inkubation der Zellen mit Serum von CBDL-Mäusen konnte mittels des MTT-Assays keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen festgestellt werden. Unter cholestatischen Bedingungen entsteht bei Mäusen ein wesentlich hydrophilerer GS-Pool (77). Möglicherweise war die Inkubationszeit zu gering, da im Tierversuch an CBDL Mäusen auch erst nach drei Tagen Gallengangsligatur erste strukturelle Veränderungen nachweisbar waren (102).

Hydrophile GS benötigen um in die Zelle zu gelangen einen Transporter (103). Eine weitere Hypothese wäre daher, dass die von uns verwendeten Zelllinien nicht über entsprechende Transporter zur Aufnahme der GS in die Zelle verfügten und so gar nicht erst im Stande waren, einen möglicherweise intrazellulären Mechanismus zu triggern, der *in vivo* zu den strukturellen Schädigungen führen würde.

Gemäß der Annahme, dass in den von uns verwendeten Zelllinien entsprechende Transporter zur intrazellulären Aufnahme der GS nicht ausgebildet waren, wie kann man sich die zytotoxischen Effekte von CDCA und TCDCA im Zellversuch erklären?

CDCA und TCDCA sind äußerst hydrophobe GS und haben möglicherweise aufgrund ihres chemischen Charakters eine direkte Wirkung auf Lipidkomponenten der Zellmembran und sind daher in der Lage, die Zellintegrität zu zerstören und dadurch in die Zelle einzudringen (70). Dies könnte in weiterer Folge zu Apoptose bzw. Nekrose und damit zu der in unseren Versuchen nachgewiesenen Abnahme der Viabilität geführt haben. Dieser direkt zytotoxische Effekt wurde allerdings nur bei entsprechend hohen Konzentrationen von hydrophoben GS ausgelöst. Da aber die Konzentrationen bei Cholestase dafür unzureichend hoch sind, und zudem ein hydrophilerer GS-Pool entsteht, ist ein direkt zytotoxischer Effekt von GS eher unwahrscheinlich (77). Wahrscheinlicher hingegen ist, dass GS als Entzündungsmediatoren wirken und dadurch im Stande sind, einen zellzerstörenden Mechanismus wie Apoptose oder Nekrose auslösen zu können. Denkbar wäre auch, dass GS durch Bindung am Todesrezeptor den extrinsischen Weg der Apoptose einleiten können oder durch Auslösen von intrazellulärem Stress an Mitochondrien oder Endoplasmatischen Retikulum es vermögen, den intrinsischen Weg der Apoptose zu initiieren (103).

Bei cholestatischen Bedingungen entsteht beim Menschen grundsätzlich zwar auch ein hydrophilerer GS-Pool, aber im Vergleich zu dem GS-Pool der Maus kommt es zu einem signifikanten Anstieg der hydrophoben GS TCDCA und GCDCA (78). Dennoch ist die Konzentration von TCDCA und GCDCA im Vergleich zu den von uns verwendeten Konzentrationen gering. Inwieweit der Nachweis über die Zytotoxizität der hydrophoben GS an MDCK- und mIMCD-3-Zellen in exzessiv hohen Dosen nun von Relevanz für den Menschen ist, muss in weiterführenden Studien an humanen Zelllinien untersucht werden.

4.2 Ergebnisse des Caspase-3-Assays

Aufgrund der rein optischen fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung kann keine eindeutige Zunahme der Caspase-3-Aktivität bei Inkubation der Zellen mit CDCA im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Aber diese Ergebnisse weisen erhebliche Einschränkungen auf, denn es wurde weder eine Wiederholung der Testung gemacht, noch wurden die Ergebnisse quantitativ ausgewertet. Allein aufgrund dieser Ergebnisse kann daher keine Aussage getroffen werden. Durch welchen Mechanismus die Sammelrohr- und Tubulusepithelzellen durch GS geschädigt werden, gilt es in Zukunft zu klären.

4.3 Fehlerquellen und Limitationen

Bei allen Experimenten wurde stets nach demselben Protokoll vorgegangen, aber dennoch kam es hin und wieder zu kontroversen Ergebnissen. Dies kann eine Reihe von Gründen haben, denn das Arbeiten mit Zellkulturen birgt einige Fehlerquellen und weist daher Limitationen bei der Interpretation der Ergebnisse auf.

Passagieren

Wartet man mit dem Passagieren zu lange, sinkt der Nährstoffgehalt und der pH-Wert im Medium, es bestehen also keine optimalen Bedingungen mehr. Durch den Wechsel von stark verbrauchtem Medium mit frischem Medium kommt es für die Zellen überdies zu einer schlagartigen Veränderung ihrer Umgebung.

Für jene Zellen, die auch mit ungünstigeren Bedingungen zurechtkommen, kann dies einen Selektionsvorteil bedeuten. Lässt man die Zellen zu konfluent wachsen, setzen sich diese Überlebenskünstler durch und können so die Zellpopulation auf Dauer verändern. Diese Zellen könnten folglich in Versuchen widerstandsfähiger gegenüber der Inkubation mit GS reagieren (92,104).

Fetales Kälberserum

Das von ungeborenen Kälberfeten gewonnene fetale Kälberserum (FBS) ist reich an für die Zellkultur wichtigen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Da es ein natürliches

Produkt darstellt, unterliegt es einer hohen Chargenvariabilität, was das standardisierte Arbeiten in der Zellkultur problematisch macht.

Überdies führen die im FBS enthaltenen Wachstumsfaktoren zu einer stark beschleunigten Proliferation, was auch gewünscht wird, aber mit der Folge, dass in den Zellen nicht alle Funktionen einer reifen Zelle vollständig ausgebildet werden (92).

Zellzahl bei den Versuchen

Die Zellen wurden beim Aussäen nicht gezählt. Dies stellt eine erhebliche Fehlerquelle dar, da die Stärke der Umwandlung von MTT in Formazan u.a. von der Anzahl an lebenden Zellen und deren metabolischen Aktivität abhängig ist (97). Befinden sich in den Wells also unterschiedlich viele Zellen, kann dies zu einer starken Streuung der Ergebnisse führen.

Tumorzellen als Ersatz für Primärzellen

Tumorzellen sind stark mutierte Zellen und können eine drastisch reduzierte Expression von organtypischen Funktionen aufweisen, was dazu führt, dass Zellwachstum und Zellteilung anderen Zellfunktionen vorgezogen werden. Die Zellen verhalten sich somit nicht gleich wie ihr Ursprungsgewebe (104).

Unphysiologische Umgebungsbedingungen

Die Standardbedingungen für Zellkultur sind nicht automatisch auch die physiologischen Bedingungen für die jeweilige Zelllinie. Währenddessen z.B. die Temperatur in der Zellkultur auf 37°C gehalten wird und damit der menschliche Organismus imitiert wird, bräuchten Zellen von Nagern eigentlich ein paar Grad wärmer. Ähnliches gilt für den pH-Wert. Während es im menschlichen Organismus nur zu sehr geringen Schwankungen des pH-Werts kommt, unterliegen die Zellen in der Zellkultur viel größeren Schwankungen z.B. beim Austausch von verbrauchtem mit frischem Medium kommt es schlagartig zu erheblichen pH-Wertveränderungen. Aufgrund des Mangels an Sauerstoff kommt es zusätzlich zur Ansäuerung des Medium, da der Stoffwechsel auf anaerob mit folglich Laktatansammlung umstellt (104).

Insgesamt gilt, dass Zellen in der Zellkultur häufig sensibler als Zellen im Organismus reagieren. Daher muss man bei der Interpretation der aus unseren Versuchen

gewonnenen Ergebnisse vorsichtig sein und sich über die eingeschränkte Aussagekraft und die Relevanz für den Menschen bewusst sein.

4.4 Möglichkeiten zur Verbesserung

Um verlässlichere und homogenere Ergebnisse zu gewährleisten, sollte man vor weiteren Versuchen die Zellzahl (Zellkammer mit oder ohne Trypanblaufärbung, Zellcounter oder Durchflusszytometrie) ermitteln. Bei kontroversen Ergebnissen z.B. bei den Versuchen mit TCA auf MDCK-Zellen, wäre es sicherlich wünschenswert gewesen, diese Versuche ein weiteres Mal zu wiederholen um die Aussagekraft zu erhöhen. Des Weiteren wäre anzudenken, zusätzlich zur Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assays ein anderes Verfahren, welches nicht auf dem gleichen Funktionsprinzip basiert (z.B. fluorescence activated cell sorting“ [FACS-Messung] oder Trypanblau-Exklusion-Test mittels Cellometer), zu verwenden und die Ergebnisse beider Verfahren zu vergleichen.

Bei weiteren Versuchen wäre es interessant, die Umgebungsbedingungen zu modifizieren. Man könnte z.B. die Wirkungen der GS bei pH-Wertänderungen untersuchen, da entzündetes Gewebe beispielsweise einen viel niedrigeren pH-Wert als gesundes aufweist. Auch Urin weist einen niedrigeren pH-Wert auf.

Da unsere Versuche mit kurzen Inkubationszeiten, aber sehr hohen, auch in hochgradig ikterischen PatientInnen/Mäusen nicht physiologischen Konzentrationen durchgeführt wurden, wäre das Verhalten von GS in niedrigeren Konzentrationen aber über längere Inkubationszeiträume von Interesse. Vor Verwendung einer Zelllinie wäre es überdies äußerst ratsam, diese zuerst auf die Expression verschiedener Transporter zu testen. Es ist nämlich sinnlos, das Verhalten von Zellen bei Inkubation mit einer Substanz zu untersuchen, wenn diese erst gar nicht in das Zellinnere gelangen kann, weil entsprechende Transporter fehlen.

4.4.1 *nor*UDCA – eine mögliche Therapieoption bei CN?

Die hydrophile GS *nor*UDCA ist ein um eine Seitenkette gekürztes Derivat von UDCA (105). Diese kleine chemische Veränderung führt zum Ausbleiben der Konjugation mit Taurin oder Gylcin. Infolgedessen durchläuft *nor*UDCA nicht den enterohepatischen Kreislauf,

sondern es kommt zum cholehepatischen *shunting*. *NorUDCA* gelangt dabei vom Lumen der Gallengänge über das periduktale Kapillarsystem zurück in die Hepatozyten. Somit kommt es zu einer Anreicherung der hydrophilen - und damit weniger toxischen *norUDCA* - in der Leber. Aufgrund der besonderen chemischen Struktur ist *norUDCA* außerdem in der Lage, die Sekretion von Bikarbonat in die Galle zu erhöhen. Zusammengefasst entsteht ein zirkulierender hydrophilerer GS-Pool, welcher der Zytotoxizität der hydrophoben GS entgegenwirkt (102,105,106). Darüber hinaus wird ein direkter antiinflammatorischer, antifibrotischer und antiproliferativer Effekt von *norUDCA* auf geschädigte Gallengänge vermutet (107).

An der *Mdr2*-Knockout Maus (*Mdr2*^{-/-}), welche ein etabliertes Modell für primär sklerosierende Cholangitis (PSC) darstellt, konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von *norUDCA* das Krankheitsbild der PSC wesentlich verbesserte (102). Aufgrund diesen und anderen präklinischen Ergebnissen stellt *norUDCA* eine sehr vielversprechende Therapieoption bei Gallenganserkrankung dar und deren Einsatz wird bereits in klinischen Studien getestet (108).

In unseren Versuchen zeigte sich, dass auch Dosisescalationen von bis zu 3000 µM, weder bei MDCK- noch bei den mMCD-3-Zellen, zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität führte. Im Tierversuch an CBDL-Mäusen konnte beobachtet werden, dass jene Tiere, die vor der Gallengangsligatur mit *norUDCA* gefüttert wurden, keine oder nur geringe Schädigungen am Tubulussystem aufwiesen. Dies und die in dieser Arbeit nachgewiesene fehlende Zytotoxizität *in vitro* bekräftigen die Hypothese, dass *norUDCA* eine mögliche Therapieoption bei CN darstellen könnte.

Doch bevor der/die Kliniker/in mit der Entscheidung über die adäquate Therapie einer CN konfrontiert wird, wird er/sie vor das Problem der adäquaten Diagnostik gestellt. In der klinischen Praxis erweist sich der Nachweis von strukturellen Nierenveränderungen nämlich als schwierig, da es derzeit kein Routineverfahren dafür gibt. Eine Biopsie stellt bis dato die einzige Nachweismethode mit akzeptabler Sensitivität dar. Bei multimorbiden Lebererkrankten mit eingeschränkter Gerinnungsfunktion ist dies sicherlich nicht als Screeningmethode zu empfehlen. Es gibt Anstrengungen, GS im Urin nachzuweisen. Dies

ist möglich, aber derzeit im Zuge der klinischen Routine noch zu aufwändig und kostspielig und hat zudem eine eingeschränkte Aussagekraft in Bezug auf eine mögliche strukturelle Schädigung. Es werden lediglich die bei Cholestase kompensatorisch renal ausgeschiedenen GS nachgewiesen, was aber noch kein Indiz für eine strukturelle Schädigung darstellt. Neue Biomarker im Urin wie z.B. Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) wurden in kleinen Studien bereits mit vielversprechendem Ergebnis getestet (109,110). Es scheint so, als könne man aufgrund verschiedener NGAL-Spiegel auf die Ätiologie des Nierenversagens schließen (111-113). Tubuläre Schädigungen bedingen demnach die höchsten Werte für NGAL, währenddessen das HRS nur zu einem moderaten Anstieg führt (113). Ob sie tatsächlich eine akzeptable Sensitivität in der Diagnostik der CN aufweisen, muss in großangelegten Studien noch getestet werden. Aufgrund der Tatsache, dass die CN derzeit nur durch eine Biopsie nachgewiesen werden kann, besteht die Gefahr, dass dadurch PatientInnen übersehen werden und allgemein das Krankheitsbild hinsichtlich Inzidenz und Prävalenz unterschätzt wird.

Gerade aufgrund der derzeit noch fehlenden diagnostischen Möglichkeiten ist es umso wichtiger, KlinikerInnen für dieses Krankheitsbild zu sensibilisieren und fehlendes Bewusstsein zu schaffen um das Outcome einer Nierenbeteiligung bei Lebererkrankung nicht unnötig aufgrund diagnostischer Verzögerung bzw. Fehldiagnose zu verschlechtern. Zwar ist die genaue Pathogenese noch nicht bekannt und auch unabhängig davon, ob nun GS in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle spielen oder nicht, kann das gehäufte Auftreten von typischen histomorphologischen Nierenveränderungen bei PatientInnen mit Lebererkrankungen nicht einfach ignoriert werden. Es besteht ein dringender Anlass, die derzeitigen Konzepte zur Entstehung des ANV bei Cholestase zu überarbeiten.

4.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit kann ein signifikanter zeit- und konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt der hydrophoben GS CDCA und TCDCA, sowohl auf MDCK- als auch auf mIMCD-3-Zellen bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass sich die Zytotoxizität der jeweiligen GS auf Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen analog zu deren Hydrophilität verhält. Demnach wirkt CA am wenigsten zytotoxisch im Zellversuch, gefolgt von ihrem Taurinkonjugat TCA.

CDCA ist unter den getesteten GS die am stärksten hydrophobe, und daher erwartungsgemäß auch die toxischste. Für ihr Taurinkonjugat TCDCA, konnte ebenso eine signifikante konzentrationsabhängige Zytotoxizität, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei CDCA, beobachtet werden. Für *norUDCA*, welche zukünftig eine Therapieoption bei der Behandlung der CN darstellen könnte, und bei deren Einsatz aufgrund der nachgewiesenen exzessiven renalen Elimination möglicherweise hohe Konzentrationen im Tubulussystem zustande kommen könnten, wurde keine zytotoxische Wirkung auf MDCK- oder mIMCD-3-Zellen beobachtet.

Aufgrund der fehlenden Abnahme der Viabilität bei Inkubation der Zellen mit ikterischem Serum kann angenommen werden, dass es bei niedrigeren GS-Konzentrationen nicht zu direkter Zytotoxizität kommt, sondern wahrscheinlich, so wie dies auch bei Behandlung von Hepatozyten mit GS gezeigt werden konnte, zum intrazellulärem Angriff der Zellorganellen, was in weiterer Folge z.B. oxidativen Stress verursachen könnte (101).

Die Liste der möglichen Pathomechanismen ist lang. In Zukunft gilt es, ein besseres Verständnis für die Entstehung der CN zu erlangen um in weiterer Folge präventiv und therapeutisch eingreifen zu können.

5 Referenzen

- (1) Fede G, D'Amico G, Arvaniti V, Tsochatzis E, Germani G, Georgiadis D, et al. Renal failure and cirrhosis: a systematic review of mortality and prognosis. *J Hepatol* 2012 Apr;56(4):810-818.
- (2) Garcia-Tsao G, Parikh CR, Viola A. Acute kidney injury in cirrhosis. *Hepatology* 2008 Dec;48(6):2064-2077.
- (3) Cholongitas E, Senzolo M, Patch D, Shaw S, O'Beirne J, Burroughs AK. Cirrhotics admitted to intensive care unit: the impact of acute renal failure on mortality. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009 Jul;21(7):744-750.
- (4) National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
- (5) Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11(2):R31.
- (6) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992 Jun;20(6):864-874.
- (7) Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002 Jan;35(1):140-148.
- (8) Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club. *Hepatology* 1996 Jan;23(1):164-176.
- (9) Moreau R, Lebrech D. Acute renal failure in patients with cirrhosis: perspectives in the age of MELD. *Hepatology* 2003 Feb;37(2):233-243.
- (10) Gines A, Escorsell A, Gines P, Salo J, Jimenez W, Inglada L, et al. Incidence, predictive factors, and prognosis of the hepatorenal syndrome in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology* 1993 Jul;105(1):229-236.
- (11) Prabhu MV, Sukanya B, Santosh Pai BH, Reddy S. The hepatorenal syndrome - a review. *G Ital Nefrol* 2014 May-Jun;31(3):gin/31.3.12.
- (12) Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999 Nov;104(9):1223-1233.

- (13) Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007 Oct;46(4):1208-1217.
- (14) Gines P, Schrier RW. Renal failure in cirrhosis. *N Engl J Med* 2009 Sep 24;361(13):1279-1290.
- (15) Wadei HM, Mai ML, Ahsan N, Gonwa TA. Hepatorenal syndrome: pathophysiology and management. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006 Sep;1(5):1066-1079.
- (16) Trawale JM, Paradis V, Rautou PE, Francoz C, Escolano S, Sallee M, et al. The spectrum of renal lesions in patients with cirrhosis: a clinicopathological study. *Liver Int* 2010 May;30(5):725-732.
- (17) van Slambrouck CM, Salem F, Meehan SM, Chang A. Bile cast nephropathy is a common pathologic finding for kidney injury associated with severe liver dysfunction. *Kidney Int* 2013 Jul;84(1):192-197.
- (18) Sanyal AJ, Boyer T, Garcia-Tsao G, Regenstein F, Rossaro L, Appenrodt B, et al. A randomized, prospective, double-blind, placebo-controlled trial of terlipressin for type 1 hepatorenal syndrome. *Gastroenterology* 2008 May;134(5):1360-1368.
- (19) Martin-Llahi M, Pepin MN, Guevara M, Diaz F, Torre A, Monescillo A, et al. Terlipressin and albumin vs albumin in patients with cirrhosis and hepatorenal syndrome: a randomized study. *Gastroenterology* 2008 May;134(5):1352-1359.
- (20) Pipili C, Cholongitas E. Renal dysfunction in patients with cirrhosis: Where do we stand? *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2014 Aug 6;5(3):156-168.
- (21) Moreau R, Durand F, Poynard T, Duhamel C, Cervoni JP, Ichai P, et al. Terlipressin in patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome: a retrospective multicenter study. *Gastroenterology* 2002 Apr;122(4):923-930.
- (22) Boyer TD, Sanyal AJ, Wong F, Frederick RT, Lake JR, O'Leary JG, et al. Terlipressin Plus Albumin Is More Effective Than Albumin Alone in Improving Renal Function in Patients With Cirrhosis and Hepatorenal Syndrome Type 1. *Gastroenterology* 2016 Jun;150(7):1579-1589.e2.
- (23) Nadim MK, Genyk YS, Tokin C, Fieber J, Ananthapanyasut W, Ye W, et al. Impact of the etiology of acute kidney injury on outcomes following liver transplantation: acute tubular necrosis versus hepatorenal syndrome. *Liver Transpl* 2012 May;18(5):539-548.
- (24) Adebayo D, Morabito V, Davenport A, Jalan R. Renal dysfunction in cirrhosis is not just a vasomotor nephropathy. *Kidney Int* 2015 Mar;87(3):509-515.

- (25) Cholongitas E, Shusang V, Marelli L, Nair D, Thomas M, Patch D, et al. Review article: renal function assessment in cirrhosis - difficulties and alternative measurements. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Oct 1;26(7):969-978.
- (26) Francoz C, Glotz D, Moreau R, Durand F. The evaluation of renal function and disease in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2010 Apr;52(4):605-613.
- (27) MacAulay J, Thompson K, Kiberd BA, Barnes DC, Peltekian KM. Serum creatinine in patients with advanced liver disease is of limited value for identification of moderate renal dysfunction: are the equations for estimating renal function better? *Can J Gastroenterol* 2006 Aug;20(8):521-526.
- (28) Wong F, Nadim MK, Kellum JA, Salerno F, Bellomo R, Gerbes A, et al. Working Party proposal for a revised classification system of renal dysfunction in patients with cirrhosis. *Gut* 2011 May;60(5):702-709.
- (29) Herget-Rosenthal S, Trabold S, Pietruck F, Holtmann M, Philipp T, Kribben A. Cystatin C: efficacy as screening test for reduced glomerular filtration rate. *Am J Nephrol* 2000 Mar-Apr;20(2):97-102.
- (30) Gerbes AL, Gulberg V, Bilzer M, Vogeser M. Evaluation of serum cystatin C concentration as a marker of renal function in patients with cirrhosis of the liver. *Gut* 2002 Jan;50(1):106-110.
- (31) Foster J, Reisman W, Lepage N, Filler G. Influence of commonly used drugs on the accuracy of cystatin C-derived glomerular filtration rate. *Pediatr Nephrol* 2006 Feb;21(2):235-238.
- (32) Gaspari F, Perico N, Remuzzi G. Measurement of glomerular filtration rate. *Kidney Int Suppl* 1997 Dec;63:S151-4.
- (33) Luciano RL, Castano E, Moeckel G, Perazella MA. Bile acid nephropathy in a bodybuilder abusing an anabolic androgenic steroid. *Am J Kidney Dis* 2014 Sep;64(3):473-476.
- (34) Coratelli P, Passavanti G. Pathophysiology of renal failure in obstructive jaundice. *Miner Electrolyte Metab* 1990;16(1):61-65.
- (35) Dawson JL. Acute post-operative renal failure in obstructive jaundice. *Ann R Coll Surg Engl* 1968 Mar;42(3):163-181.
- (36) Masumoto T, Masuoka S. Kidney function in the severely jaundiced dog. *Am J Surg* 1980 Sep;140(3):426-430.
- (37) Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2008 Feb;12(1):1-26, vii.
- (38) WALKER JG. Renal failure in jaundice. *Proc R Soc Med* 1962 Jul;55:570.

- (39) Montini G, Carasi C, Zancan L, Dall'Amico R, Murer L, Zacchello G, et al. Chronic cholestatic liver disease with associated tubulointerstitial nephropathy in early childhood. *Pediatrics* 1997 Sep;100(3):E10.
- (40) Neuhaus TJ, Stallmach T, Leumann E, Altorfer J, Braegger CP. Familial progressive tubulo-interstitial nephropathy and cholestatic liver disease -- a newly recognized entity? *Eur J Pediatr* 1997 Sep;156(9):723-726.
- (41) Popovic-Rolovic M, Kostic M, Sindjic M, Jovanovic O, Peco-Antic A, Kruscic D. Progressive tubulointerstitial nephritis and chronic cholestatic liver disease. *Pediatr Nephrol* 1993 Aug;7(4):396-400.
- (42) Harris HW, Jr, Carpenter TO, Shanley P, Rosen S, Levey RH, Harmon WE. Progressive tubulointerstitial renal disease in infancy with associated hepatic abnormalities. *Am J Med* 1986 Jul;81(1):169-176.
- (43) Rafat C, Burbach M, Brocheriou I, Zafrani L, Callard P, Rondeau E, et al. Bilirubin-associated acute tubular necrosis in a kidney transplant recipient. *Am J Kidney Dis* 2013 May;61(5):782-785.
- (44) WILLIAMS RD, ELLIOTT DW, ZOLLINGER RM. The effect of hypotension in obstructive jaundice. *Arch Surg* 1960 Aug;81:334-340.
- (45) ZOLLINGER RM, WILLIAMS RD. Surgical aspects of jaundice. *Surgery* 1956 Jun;39(6):1016-1030.
- (46) Bomzon A, Holt S, Moore K. Bile acids, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction. *Semin Nephrol* 1997 Nov;17(6):549-562.
- (47) Nath KA. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int* 2006 Aug;70(3):432-443.
- (48) Oh SW, Lee ES, Kim S, Na KY, Chae DW, Kim S, et al. Bilirubin attenuates the renal tubular injury by inhibition of oxidative stress and apoptosis. *BMC Nephrol* 2013 May 17;14:105-2369-14-105.
- (49) Deetman PE, Zelle DM, Homan van der Heide JJ, Navis GJ, Gans RO, Bakker SJ. Plasma bilirubin and late graft failure in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2012 Aug;25(8):876-881.
- (50) Romano TG, Vieira Junior JM. Do Biliary Salts Have Role on Acute Kidney Injury Development? *J Clin Med Res* 2015 Sep;7(9):667-671.
- (51) Gollan JL, Billing BH, Huang SN. Ultrastructural changes in the isolated rat kidney induced by conjugated bilirubin and bile acids. *Br J Exp Pathol* 1976 Oct;57(5):571-581.
- (52) Clements WD, Parks R, Erwin P, Halliday MI, Barr J, Rowlands BJ. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut* 1996 Oct;39(4):587-593.

- (53) Shah N, Dhar D, El Zahraa Mohammed F, Habtesion A, Davies NA, Jover-Cobos M, et al. Prevention of acute kidney injury in a rodent model of cirrhosis following selective gut decontamination is associated with reduced renal TLR4 expression. *J Hepatol* 2012 May;56(5):1047-1053.
- (54) Fickert P, Krones E, Pollheimer MJ, Thueringer A, Moustafa T, Silbert D, et al. Bile acids trigger cholemic nephropathy in common bile-duct-ligated mice. *Hepatology* 2013 Dec;58(6):2056-2069.
- (55) Krones E, Wagner M, Eller K, Rosenkranz AR, Trauner M, Fickert P. Bile acid-induced cholemic nephropathy. *Dig Dis* 2015;33(3):367-375.
- (56) Sanders PW, Booker BB. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *J Clin Invest* 1992 Feb;89(2):630-639.
- (57) Pirani CL, Silva F, D'Agati V, Chander P, Striker LM. Renal lesions in plasma cell dyscrasias: ultrastructural observations. *Am J Kidney Dis* 1987 Sep;10(3):208-221.
- (58) Uslu A, Tasli FA, Nart A, Postaci H, Aykas A, Bati H, et al. Human kidney histopathology in acute obstructive jaundice: a prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010 Dec;22(12):1458-1465.
- (59) Betjes MG, Bajema I. The pathology of jaundice-related renal insufficiency: cholemic nephrosis revisited. *J Nephrol* 2006 Mar-Apr;19(2):229-233.
- (60) Song J, Chang A. Jaundice-associated acute kidney injury. *NDT Plus* 2009 Feb;2(1):82-83.
- (61) van der Wijngaart H, van Dam B, van den Berg JG, Krul-Poel YH, Klemm-Kropp M, Bax WA. A 73-year-old male with jaundice and acute kidney injury. Bile cast nephropathy. *Neth J Med* 2014 Feb;72(2):95, 99.
- (62) Shet T, Kandalkar B, Balasubramaniam M, Phatak A. The renal pathology in children dying with hepatic cirrhosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2002 Jan;45(1):39-43.
- (63) Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999 Dec 13-27;159(22):2647-2658.
- (64) Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Oct;25(10):2020-2030.
- (65) Claudel T, Zollner G, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim Biophys Acta* 2011 Aug;1812(8):867-878.
- (66) Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med* 2007 Jul;13(7):298-309.

- (67) Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* 1999 Feb;14:24-29.
- (68) Lo Sasso G, Petruzzelli M, Moschetta A. A translational view on the biliary lipid secretory network. *Biochim Biophys Acta* 2008 Mar;1781(3):79-96.
- (69) Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009 Oct;50(10):1955-1966.
- (70) Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009 Feb 21;15(7):804-816.
- (71) Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S120-5.
- (72) Riemann, J. Fischbach, W. Galle, P. editor. *Gastroenterologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band: 1*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008.
- (73) Horn F editor. *Biochemie des Menschen*. 5th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012.
- (74) Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008 Aug;65(16):2461-2483.
- (75) Hofmann AF, Mysels KJ. Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *J Lipid Res* 1992 May;33(5):617-626.
- (76) de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab* 2013 May 7;17(5):657-669.
- (77) Zhang Y, Hong JY, Rockwell CE, Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD. Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver. *Liver Int* 2012 Jan;32(1):58-69.
- (78) Trottier J, Bialek A, Caron P, Straka RJ, Milkiewicz P, Barbier O. Profiling circulating and urinary bile acids in patients with biliary obstruction before and after biliary stenting. *PLoS One* 2011;6(7):e22094.
- (79) Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009 Apr 14;15(14):1677-1689.
- (80) Frijters CM, Tuijn CJ, Ottenhoff R, Zegers BN, Groen AK, Elferink RP. The role of different P-glycoproteins in hepatobiliary secretion of fluorescently labeled short-chain phospholipids. *J Lipid Res* 1999 Nov;40(11):1950-1958.
- (81) Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004 Jan;126(1):322-342.

- (82) Dawson PA, Hubbert ML, Rao A. Getting the mOST from OST: Role of organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta, in bile acid and steroid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2010 Sep;1801(9):994-1004.
- (83) Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 2005 Apr;39(4 Suppl 2):S111-24.
- (84) Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003 Apr;83(2):633-671.
- (85) Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol* 2013 Jan;58(1):155-168.
- (86) Dawson PA, Karpen SJ. Intestinal Transport and Metabolism of Bile Acids. *J Lipid Res* 2014 Sep 10.
- (87) Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol* 2009 Sep;51(3):565-580.
- (88) Zollner G, Trauner M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr* 2006 Jul;156(13-14):380-385.
- (89) Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Marschall HU, Zatloukal K, et al. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003 Jun;38(6):717-727.
- (90) Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A, Setchell KD, et al. Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 2001 Dec;121(6):1473-1484.
- (91) Trauner M, Baghdasaryan A, Claudel T, Fickert P, Halilbasic E, Moustafa T, et al. Targeting nuclear bile acid receptors for liver disease. *Dig Dis* 2011;29(1):98-102.
- (92) Schmitz S editor. *Experimentator - Zellkultur*. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
- (93) Herzlinger DA, Easton TG, Ojakian GK. The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule. *J Cell Biol* 1982 May;93(2):269-277.
- (94) Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol* 2011 Oct 7;12:43-2121-12-43.
- (95) Rauchman MI, Nigam SK, Delpire E, Gullans SR. An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *Am J Physiol* 1993 Sep;265(3 Pt 2):F416-24.

- (96) Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 1995 Jun;5(2):69-84.
- (97) Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al, editors. *Assay Guidance Manual* Bethesda (MD); 2004.
- (98) Berridge M, Tan A, McCoy K, Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. 1996; Available at: https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/BIOCHEMICA_96_4_p14-19.pdf. Accessed November/12, 2015.
- (99) Delzenne NM, Calderon PB, Taper HS, Roberfroid MB. Comparative hepatotoxicity of cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid in the rat: in vivo and in vitro studies. *Toxicol Lett* 1992 Jul;61(2-3):291-304.
- (100) Benedetti A, Alvaro D, Bassotti C, Gigliozzi A, Ferretti G, La Rosa T, et al. Cytotoxicity of bile salts against biliary epithelium: a study in isolated bile ductule fragments and isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1997 Jul;26(1):9-21.
- (101) Rolo AP, Palmeira CM, Wallace KB. Interactions of combined bile acids on hepatocyte viability: cytoprotection or synergism. *Toxicol Lett* 2002 Feb 7;126(3):197-203.
- (102) Fickert P, Wagner M, Marschall HU, Fuchsbichler A, Zollner G, Tsybrovskyy O, et al. 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2006 Feb;130(2):465-481.
- (103) Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009 Apr 14;15(14):1677-1689.
- (104) Hartung T. Vor- und Nachdenkliches zur Zellkultur. Available at: http://www.altex.ch/resources/altex_2007_3_148_152_FFT_HartungD.PDF. Accessed 01/04, 2016.
- (105) Hofmann AF, Zakko SF, Lira M, Clerici C, Hagey LR, Lambert KK, et al. Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans. *Hepatology* 2005 Dec;42(6):1391-1398.
- (106) Yoon YB, Hagey LR, Hofmann AF, Gurantz D, Michelotti EL, Steinbach JH. Effect of side-chain shortening on the physiologic properties of bile acids: hepatic transport and effect on biliary secretion of 23-nor-ursodeoxycholate in rodents. *Gastroenterology* 1986 Apr;90(4):837-852.
- (107) Trauner M, Halilbasic E, Baghdasaryan A, Moustafa T, Krones E, Fickert P, et al. Primary sclerosing cholangitis: new approaches to diagnosis, surveillance and treatment. *Dig Dis* 2012;30 Suppl 1:39-47.

- (108) Trauner M, Halilbasic E, Claudel T, Steinacher D, Fuchs C, Moustafa T, et al. Potential of nor-Ursodeoxycholic Acid in Cholestatic and Metabolic Disorders. *Dig Dis* 2015;33(3):433-439.
- (109) Ostermann M, Philips BJ, Forni LG. Clinical review: Biomarkers of acute kidney injury: where are we now? *Crit Care* 2012 Sep 21;16(5):233.
- (110) Firu SG, Streba CT, Firu D, Tache DE, Rogoveanu I. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) - a biomarker of renal dysfunction in patients with liver cirrhosis: Do we have enough proof? *J Med Life* 2015;8 Spec Issue:15-20.
- (111) Verna EC, Brown RS, Farrand E, Pichardo EM, Forster CS, Sola-Del Valle DA, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts mortality and identifies acute kidney injury in cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2012 Sep;57(9):2362-2370.
- (112) Qasem AA, Farag SE, Hamed E, Emara M, Bihery A, Pasha H. Urinary biomarkers of acute kidney injury in patients with liver cirrhosis. *ISRN Nephrol* 2014 Apr 6;2014:376795.
- (113) Fagundes C, Pepin MN, Guevara M, Barreto R, Casals G, Sola E, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as biomarker in the differential diagnosis of impairment of kidney function in cirrhosis. *J Hepatol* 2012 Aug;57(2):267-273.

6 Anhang

Genauer Mengenanteil von Stocksolution und Medium

<u>Verdünnung</u>	<u>Menge an Stocksolution</u>	<u>Menge an Medium</u>
-------------------	-----------------------------------	----------------------------

CA 100mM Stock

100 µM	10 µl	3990 µl
500 µM	50 µl	3950 µl
1000 µM	40 µl	3960 µl
2000 µM	80 µl	3879 µl

CDCA 33mM Stock

50 µM	6,06 µl	3994 µl
100 µM	12 µl	3988 µl
500 µM	60,6 µl	3940 µl
1000 µM	121,2 µl	3879 µl

TCA 18mM Stock

500 µM	111 µl	3889 µl
1000 µM	222 µl	3778 µl
2000 µM	444 µl	3556 µl

TCDCA 25mM Stock

500 µM	80µl	3920 µl
1000 µM	160 µl	3840 µl
2000 µM	320 µl	3680 µl

NorUrso 25mM Stock

500 µM	80 µl	3920 µl
1000 µM	160 µl	3840 µl
2000 µM	320 µl	3680 µl
3000 µM	480 µl	3520 µl