

PADMA HEPATEN hemmt Leberfibrosierung im Mausmodell

Zusammenfassung der Publikation:

Ginsburg I, Koren E, Horani A, Mahamid M, Doron S, Muhanna N, Amer J, Safadi R.

Amelioration of hepatic fibrosis via PADMA HEPATEN is associated with altered NKT lymphocytes.

Clinical and Experimental Immunology 2009, 157:155–164 (Impact Factor 2.599).

Ursachen und Bedeutung der Leberfibrose

Bei der Leberfibrose vermehrt sich das Bindegewebe, es vernarbt und verdrängt nach und nach die eigentlichen Leberzellen. Durch die Kompensationsfähigkeit des noch gesunden Lebergewebes bleibt die Fibrosierung oft für lange Zeit ohne klinische Symptome. Schreitet der Fibrosierungsprozess fort kann es zu Leberzirrhose (Schrumpfleber) und evtl. später zu Leberkrebs kommen. Bei einer starken Lebervernarbung sind die Synthesefunktion (Gerinnungsfaktoren, Albumin) und die Entgiftungsfunktion der Leber beeinträchtigt, was zu Hepatische Enzephalopathie und Leberkoma führen kann.

Eine Fibrosierung des Lebergewebes ist die Folge einer chronischen Leberschädigung und tritt im Laufe vieler Erkrankungen auf. Häufige Ursachen sind: Chronische Virushepatitis (ca. 1-10% bei Hepatitis B Infektion und ca. 10-25% bei Hepatitis C Infektionen), chronischer Alkoholismus, Fettleber-Hepatitis (non alcoholic steatohepatitis NASH, z.B. bei Diabetes mellitus), chronische Gallenstauung (z.B. durch Gallensteine, Tumoren, Virushepatitiden, Arzneimittel oder Giftstoffe) oder chronischer Einfluss lebertoxischer Substanzen (z.B. Arzneimittel).

Bei der Therapie muss eine allfällige Grunderkrankung behandelt werden. Eine medikamentöse Therapie, die den Fibrosierungsprozess per se sicher aufhalten kann, ist derzeit noch nicht etabliert. Besonders wichtig ist die Vermeidung von jeglichen Lebertoxischen Substanzen (z.B. Alkohol).

Bedeutung in der Bevölkerungsstatistik: In den Industrieländern tritt Leberzirrhose bei ca. 250 Personen pro 100.000 Einwohner und Jahr neu auf. In der Schweiz war 2007 alkoholische Leberzirrhose verantwortlich für 1% aller Sterbefälle bei Männern (Frauen 0.55%). Die Todesursachenstatistik Deutschland 2004 besagt, dass Krankheiten der Leber für 2.1% aller Sterbefälle verantwortlich waren mit einem durchschnittlichen Sterbealter von 62,7 Jahren. Die größte Bedeutung hatten die alkoholische Leberkrankheit (1.26%) sowie die Fibrose und Zirrhose der Leber (0.7%).

Studiendesign

Mäuse wurden in 4 Gruppen eingeteilt.

Gruppe 1	keine Leberfibrose	keine Behandlung
Gruppe 2	Leberfibrose*	keine Behandlung
Gruppe 3	Leberfibrose*	PADMA HEPATEN per os**
Gruppe 4	Leberfibrose*	PADMA HEPATEN i.p.**

* durch CCl₄-Injektion induziert

** Behandlungsschema siehe Tabelle 1

Das Ausmass der Entwicklung der Leberfibrose wurde anhand verschiedener Parameter gemessen.

In einem zweiten Teil der Studie wurden Immunzellen aus der Milz entnommen und anderen Versuchstieren intraperitoneal gespritzt. Gruppe 5 erhielt Immunzellen von unbehandelten Mäusen und Gruppe 6 solche von Tieren, die intraperitoneal mit PADMA HEPATEN behandelt worden waren. In beiden Gruppen wurde eine Leberfibrose induziert und ihr Ausmass gemessen.

Resultate und Schlussfolgerung:

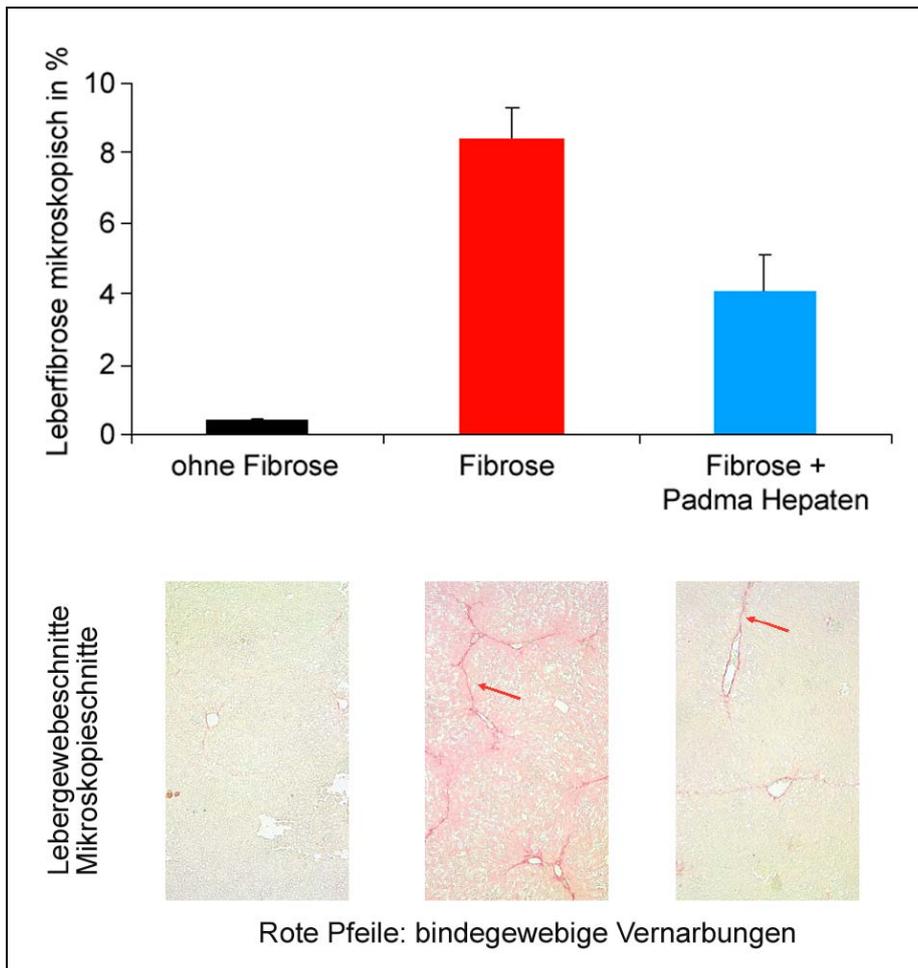
Tiere, die mit PADMA HEPATEN behandelt wurden entwickelten viel weniger Leberfibrose als unbehandelte Tiere. Dies zeigte sich in allen gemessenen Parametern. Der leberzellschützende Effekt ist vermutlich auf eine Beeinflussung der Zusammensetzung von Lymphozyten-Untergruppen, insbesondere eine Hemmung der profibrotischen CD8- und NKT-Zellen zurückzuführen.

Gemessene Parameter und ihre Bedeutung

a) Mikroskopische Beurteilung der Lebervernarbung (Histologie)

Schnitte von Lebergewebe wurden mit Sirius Red gefärbt. Die Vernarbung wurde als Vermehrung von Bindegewebe gemessen und die fibrosierte Fläche und in % angegeben. Bei der Leberfibrose kommt es zu einer Einlagerung von Bindegewebe in der Leber, quasi einer Vernarbung.

Resultat: Unter dem Mikroskop konnte bei der unbehandelten Fibrosegruppe (Gruppe 2) eine deutliche Vermehrung von Bindegewebe festgestellt werden, die bei PADMA HEPATEN behandelten Mäusen signifikant geringer war.

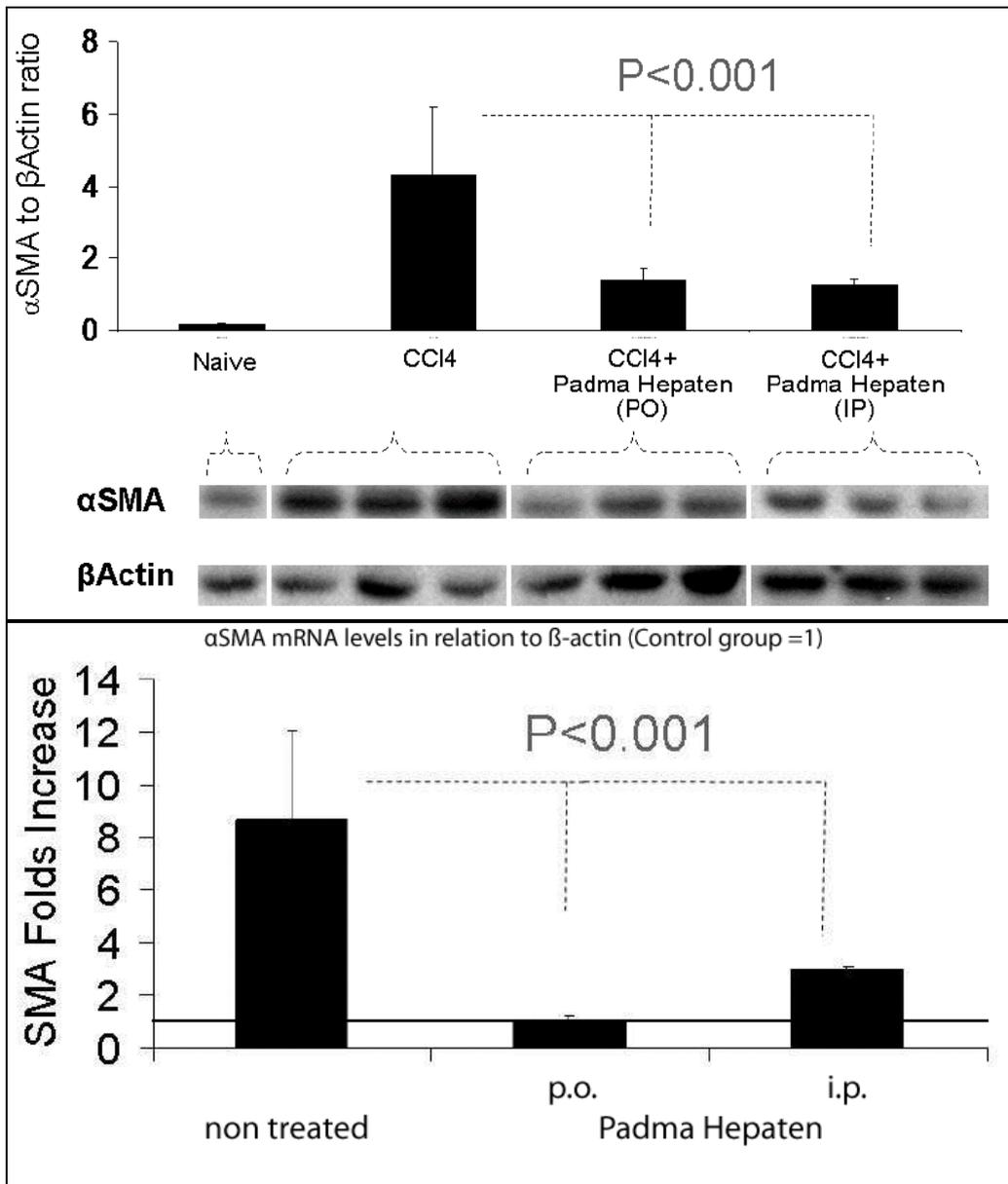


b) Aktivierung von Ito-Zellen (hepatic stellate cells HSC) anhand von Proteinmessung

Das Protein Aktin alpha (alpha smooth muscle actin, α -SMA) ist ein Strukturprotein, das in sog. Ito-Zellen (auch hepatic stellate cells, HSC), nicht aber in Leberzellen vorkommt. HSC speichern Vitamin A in der Leber und bilden Komponenten der extrazelluläre Matrix, z.B. Kollagen. Das Protein alpha smooth muscle actin (α -SMA) ist ein Marker für die im Rahmen einer Schädigung stattfindende Aktivierung von HSC und damit auch für das Ausmass der Leberschädigung.

α -SMA wurde einerseits auf dem Genexpressionslevel (mRNA Gehalt via PCR-Technik) wie auch auf dem Proteinlevel (via Westerblot-Technik) gemessen. Damit die gemessenen Werte vergleichbar sind wurden sie jeweils in Bezug zum Haushaltsprotein β -Aktin gesetzt.

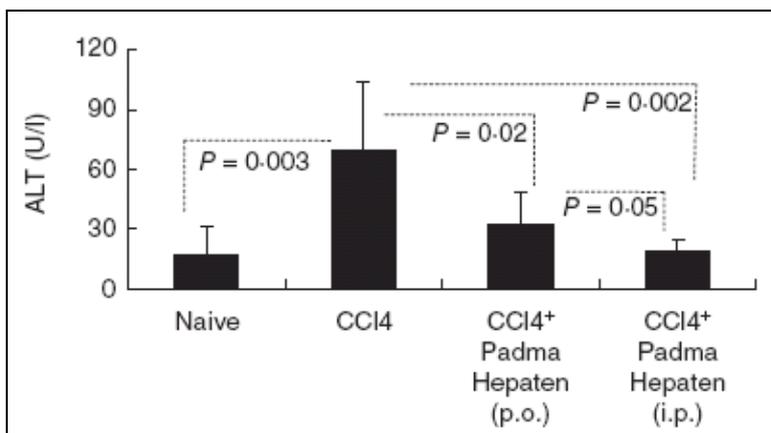
Resultat: α -SMA war sowohl auf Protein- wie auf mRNA-Level deutlich erhöht bei fibrotischen unbehandelten Tieren. Bei Behandlung mit PADMA HEPATEN waren die Werte erniedrigt und nahe am Level von nicht fibrotischen Kontrolltieren.



c) Messung des ALT-Spiegels im Serum

ALT (Alanin Aminotransaminase) ist ein Leberenzym, das bei Leberzellschädigung unterschiedlicher Ursachen vermehrt im Blut auftaucht und ist in gewissem Mass ein Hinweis auf das Ausmass der Leberzellschädigung.

Resultat: ALT war erwartungsgemäss in fibrotischen Tieren erhöht. In PADMA HEPATEN behandelten Tieren war der ALT level signifikant erniedrigt und nahe am Spiegel der afibrotischen Tiere.



c) Anzahl und Differenzierung von Lymphozyten

Bei Leberfibrose sind die Lymphozytenzahlen in der Leber allgemein erhöht. Verschiedene Untergruppen von Lymphozyten beeinflussen die Entstehung von Leberfibrose unterschiedlich. So sind CD4 und natural killer cells (NK) anti-fibrotisch und CD8 Zellen und vermutlich auch natural killer T-Zellen (NKT) profibrotisch.

Resultate: Die Resultate zeigen nicht eine eindeutige antifibrotische Wirkung auf. Die beiden Verabreichungsformen p.o. und i.p. ergeben unterschiedliche Resultate. Ein gutes Resultat zeigt sich v.a. bei p.o. Verabreichung. der Anteil an CD4-Zellen wird nicht beeinflusst, CD8 sind jedoch gehemmt im Vergleich zu unbehandelten fibrotischen Tieren. Damit würde auch das Verhältnis CD4/CD8 erhöht, das antifibrotisch wirkt. PADMA HEPATEN i.p. und p.o. senken sowohl die antifibrotischen NK-Zellen als auch die profibrotischen NKT-Zellen.

Bei der Betrachtung der absoluten Anzahl von Leukozyten zeigt sich in unbehandelten fibrotischen Tieren eine Steigerung aller von allen untersuchten Lymphozyten-Gruppen. Diese war für alle Zellen unter PADMA HEPATEN-Behandlung niedriger als bei unbehandelten Tieren (Abb. b).

