

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der perfundierten Rattenleber erhöhen die Anaphylatoxine C5a und C3a – Peptide der aktivierten Komplementkaskade – kurzfristig die Glucose-Freisetzung, reduzieren den Fluß und steigern den Prostanoid-Überlauf in die Lebervene. Die metabolischen Reaktionen werden durch den Prostanoid-Synthese-Inhibitor Indomethacin und durch den Thromboxan-(TX-) Rezeptor-Antagonisten Daltroban gehemmt; sie werden also maßgeblich durch Prostanoiden vermittelt, deren Hauptsyntheseort die sessilen Makrophagen der Leber, die Kupferzellen, sind. Die freigesetzten Prostaglandine (PG) können direkt die Glykogenphosphorylase der Hepatocyten aktivieren, da diese Zellen entsprechende PG-Rezeptoren besitzen. Im Gegensatz dazu muß Thromboxan indirekt wirken, da Hepatozyten keine TX-Rezeptoren exprimieren. Ähnliche Effekte auf Stoffwechsel und Hämodynamik wie für Anaphylatoxine sind auch für verschiedene Auslöser von Entzündungen, z.B. Zymosan oder Lipopolysaccharid (LPS) beschrieben; diese Substanzen bewirken ebenfalls eine Prostanoid-Freisetzung aus Kupferzellen. Daraus ergaben sich die folgenden Fragen:

1. Wird die TX-induzierte, indirekte Glucose-Freisetzung der perfundierten Rattenleber durch eine TX-vermittelte Steigerung der Prostaglandin-Synthese selbst oder durch eine Freisetzung anderer löslicher Mediatoren aus TX-Rezeptor-tragenden Nichtparenchymzellen (sinusoidale Endothelzellen, Kupferzellen) ausgelöst? Oder liegt ihr ggf. ein anderer hämodynamischer Mechanismus zugrunde?
2. Wie unterscheidet sich die Prostanoid-Freisetzung aus kultivierten Kupferzellen nach Stimulation mit rekombinantem Ratten C5a (rrC5a), Zymosan und LPS und welche Enzyme sind jeweils an der Regulation beteiligt?
3. Modulieren Thromboxan oder Prostaglandine ihre eigene rrC5a-, Zymosan- und LPS-induzierte Synthese in Kupferzellen?

ad 1. Das TXA₂-Analog U46619 löste in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen und Kupferzellen, welche eine starke Expression von TX-Rezeptor-mRNA aufweisen, kurzfristig keine Sekretion von Prostaglandinen aus. In kultivierten SEC bewirkte es weder eine Freisetzung von Platelet Activating Factor noch von Endothelin-1 (für beide wird die Aktivierung der Glykogenphosphorylase in Hepatocyten diskutiert). In Kokulturerperimenten von sinusoidalen Endothelzellen, Perisinusoidalzellen oder Kupferzellen mit Hepatocyten aktivierte U46619 die Glykogenphosphorylase nicht; deshalb konnte ein löslicher Faktor aus Nichtparenchymzellen als Mediator der TX-bedingten Aktivierung der Glykogenphosphorylase

ausgeschlossen werden. In der isolierten *in situ* Leberperfusion wurden die TX-vermittelte erhöhte Glucose-Freisetzung – im Gegensatz zu der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vermittelten – und gleichzeitig die Fluß-Reduktion durch Ca^{2+} -Entzug fast vollständig aufgehoben. Das deutet darauf hin, daß die TX-induzierte Glykogenphosphorylase-Aktivierung wahrscheinlich durch eine flußreduktions-bedingte partielle Hypoxie vermittelt wurde.

ad 2. Die Prostanoid-Sekretion wurde in kultivierten Kupfferzellen durch rrC5a oder Zymosan innerhalb von Minuten (Maximum: rrC5a 5 min, Zymosan 30 min), durch LPS jedoch erst nach Stunden (Maximum: > 5h) gesteigert. Das Verhältnis von PGD_2 : PGE_2 , das – insbesondere vor dem Hintergrund der im Organismus meist antiinflammatorischen Wirkung von PGE_2 – von großer Bedeutung für die Steuerung der jeweiligen Zielzelle ist, war für rrC5a und Zymosan größer als für LPS. Die Unterschiede in Kinetik, Menge und Verhältnis der Prostanoid-Freisetzung aus Kupfferzellen nach rrC5a , Zymosan und LPS deuten auf verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege zur Prostanoid-Syntheseregulation hin. rrC5a und Zymosan erhöhten den Phospholipase-Umsatz, während LPS die Expression der Cyclooxygenase-2-mRNA in Kupfferzellen deutlich steigerte. Bei Kostimulation der Kupfferzellen mit rrC5a und LPS zeigte sich keine Additivität bei der Steigerung der Prostanoid-Freisetzung.

ad 3. Das TXA_2 -Analog U46619 und PGD_2 hatten keinen Einfluß auf die rrC5a -induzierte Prostanoid-Freisetzung. PGE_2 inhibierte dagegen sowohl die rrC5a - als auch die LPS-, aber nicht die Zymosan-induzierte Prostanoid-Sekretion aus Kupfferzellen. Folglich war die autoregulatorische Rückkopplungshemmung der Prostanoid-Freisetzung Stimulus-abhängig und spezifisch für PGE_2 . Dieser Effekt war auf eine Reduktion des Phospholipase-Umsatzes sowohl nach rrC5a - als auch nach LPS-, nicht aber nach Zymosan-Gabe zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigen, daß der TX-vermittelte Anteil der C5a -abhängigen Steigerung der Glucose-Freisetzung der perfundierten Rattenleber nicht durch eine Erhöhung der Freisetzung von Prostaglandinen, Platelet Activating Factor oder Endothelin aus Nichtparenchymzellen, sondern durch eine Hypoxie auslösende Fluß-Reduktion bewirkt wurde. Weiterhin belegen sie, daß C5a im Vergleich mit zwei anderen Auslösern akuter Entzündungen, Zymosan und LPS, Prostaglandine und Thromboxan aus kultivierten Kupfferzellen mit der schnellsten Kinetik freisetzte und daß PGE_2 , nicht aber die anderen Prostanoiden abhängig vom Auslöser die Prostanoid-Synthese durch negative Rückkopplung hemmte.

SUMMARY

Sabine Pestel: Anaphylatoxin C5a-induced glucose-release from hepatocytes of the perfused rat liver: mediation by a hemodynamic and hypoxia-induced effect of thromboxane A₂ from Kupffer cells

In the perfused rat liver the anaphylatoxins C5a and C3a – which are peptides of the activated complement cascade – increase glucose output, reduce flow and enhance prostanoid overflow as short-term actions. The metabolic effects are suppressed by the prostanoid-synthesis inhibitor indomethacin and by the thromboxane- (TX-) receptor antagonist daltroban; they were thus mainly mediated by prostanoids, which are synthesized mainly by Kupffer cells – the sessile macrophages of the liver. The released prostaglandins (PG) could directly activate glycogen phosphorylase in hepatocytes, since these cells have the appropriate receptors. In contrast, thromboxane has to act indirectly, since hepatocytes do not express TX-receptors. Similar metabolic and hemodynamic responses as after anaphylatoxin-stimulation are also described for other inducers of inflammation, e.g. zymosan or lipopolysaccharide (LPS). These substances induce – like C5a – the release of prostanoids from Kupffer cells. Thus, the following questions were arrived at:

1. Is the TX-induced, indirect effect on glucose release by the perfused rat liver mediated by a TX-induced increase in PG-synthesis itself or by a release of other soluble mediators from TX-receptor bearing non-parenchymal cells (sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells)? Or is it possibly mediated via a hemodynamic mechanism?
2. Which are the differences in prostanoid release from Kupffer cells induced by recombinant rat C5a (rC5a), zymosan and LPS, and which enzymes are involved in each particular regulation?
3. Do thromboxane or prostaglandins modulate their own rC5a-, zymosan- or LPS-induced synthesis in Kupffer cells?

ad 1. In cultured Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells, which strongly express TX-receptor-mRNA, the TXA₂-analog U46619 did not induce a short-term synthesis of prostanoids. In cultured sinusoidal endothelial cells it neither enhanced the release of platelet activating factor, nor of endothelin-1, which are both considered to activate glycogen phosphorylase in hepatocytes. Also, U46619 did not activate glycogen phosphorylase in cocultures of

hepatocytes with sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells or hepatic stellate cells. Thus, the TX-induced indirect activation of glycogen phosphorylase is not mediated by a soluble factor released from nonparenchymal cells. In isolated rat livers perfused with Ca^{2+} -free media the TX-induced – in contrast to the $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced – glucose release was prevented to about the same degree as flow reduction. This indicates, that the TX-induced activation of glycogen phosphorylase was correlated to flow effects and thus might be mediated by flow-induced partial hypoxia.

ad 2 Prostanoid release was induced in cultured Kupffer cells within minutes by rrC5a (maximum 5 min) and zymosan (maximum 30 min), but only within hours by LPS (maximum > 5 h). The ratio of PGD_2 : PGE_2 , which is of relevance for the action on the target cell – especially due to the often antiinflammatory role of PGE_2 in the organism – , was higher for rrC5a and zymosan than for LPS. The differences in kinetics, amount and ratio of prostanoid release from Kupffer cells after stimulation with rrC5a , zymosan and LPS indicate that different intracellular signal transduction cascades are involved in the regulation of prostanoid synthesis. In fact, rrC5a and zymosan upregulated the activity of phospholipases, while LPS enhanced the expression of cyclooxygenase-2 mRNA in Kupffer cells. Costimulation with rrC5a and LPS had no synergistic effect on prostanoid release.

ad 3. The TX-analog U46619 and PGD_2 had no effect on the rrC5a -induced prostanoid synthesis. In contrast, PGE_2 strongly inhibited not only the short-term rrC5a -, but also the long-term lipopolysaccharide-, but not the zymosan-induced prostanoid release from Kupffer cells. Thus, the autoregulatory feedback inhibition of prostanoid output was stimulus-dependent and specific for PGE_2 . This inhibition was due to the reduction of phospholipase-turnover in the presence of rrC5a and LPS, but not of zymosan.

In conclusion, it was shown that the TX-mediated part of C5a -induced glucose output from perfused rat liver was not due to an enhanced release of prostaglandins, platelet activating factor or endothelin, but to hypoxia induced by flow reduction. Furthermore, these data show, that C5a in comparison with two other inducers of acute inflammation, zymosan and LPS, activated prostanoid-release from Kupffer cells with the fastest kinetics and that PGE_2 , but no other prostanoids, downregulated – dependent on the inducer – the release of prostanoids by a negative feedback mechanism.