

Aus dem
Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Therapeutisches Potential von Antileukoproteinase
in einem Modell des akuten septischen Leberversagens**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
2008

vorgelegt von:

Evelyn Kidess

Geboren am 29.10.1983

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar,
Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Harald Burkhardt,
Abteilung Rheumatologie, Medizinische Klinik II, Johann-Wolfgang-Universität Frankfurt
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Jan Stange,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin / Abteilung für Nephrologie und Dialyse, Universitätsklinikum Rostock

Datum der Verteidigung: 03.02.2009

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	4
ZUSAMMENFASSUNG.....	7
ABSTRACT.....	9
1. EINLEITUNG.....	10
1.1 Sepsis.....	10
1.1.1 Definition.....	10
1.1.2 Geschichte.....	11
1.1.3 Epidemiologie.....	12
1.1.4 Ätiologie.....	12
1.1.5 Pathophysiologie.....	12
1.1.5.1 <i>Allgemeine Pathophysiologie.....</i>	<i>12</i>
1.1.5.2 <i>Spezielle Pathophysiologie.....</i>	<i>14</i>
1.1.6 Die Bedeutung des akuten Leberversagens bei Sepsis.....	17
1.1.7 Symptome und Diagnose.....	18
1.1.8 Therapie.....	19
1.2 Endotoxinämiemodell.....	21
1.2.1 D-Galactosamin.....	21
1.2.2 Lipopolysaccharid.....	22
1.3 Tumor Nekrose Faktor-α.....	23
1.4 Interleukin-10.....	24
1.5 Antileukoproteinase.....	25
1.6 Ziele der Arbeit und Fragestellung.....	28
2. MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1 Versuchstiere.....	29
2.2 Modell.....	29
2.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation.....	29
2.2.2 Vorbereitung der Tiere zur Durchführung der in vivo Mikroskopie.....	30
2.2.3 Experimentelle Gruppen und Prämedikation.....	31

2.3 Rekombinante Antileukoproteinase.....	32
2.4 Untersuchungstechniken.....	32
2.4.1 Makrohämodynamik.....	32
2.4.2 Mikrozirkulation der Leber.....	33
2.4.2.1 <i>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie – Grundlagen.....</i>	<i>33</i>
2.4.2.2 <i>Fluoreszenzfarbstoffe.....</i>	<i>35</i>
2.4.3 Mikrozirkulatorische Parameter.....	36
2.4.3.1 <i>Sinusoidale Perfusion.....</i>	<i>36</i>
2.4.3.2 <i>Mikrovaskuläre Leukozyten-Akkumulation.....</i>	<i>37</i>
2.4.4 Probeentnahmen und Analyse.....	37
2.4.4.1 <i>Blutentnahmen.....</i>	<i>38</i>
2.4.4.2 <i>Gewebeproben.....</i>	<i>38</i>
2.4.5 Vollblut- und Serumanalytik.....	38
2.4.5.1 <i>Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Serum.....</i>	<i>38</i>
2.4.5.2 <i>Bioplex Protein Array System.....</i>	<i>39</i>
2.4.6 Histologie.....	40
2.4.7 Immunhistochemie.....	41
2.4.7.1 <i>Nuclear Factor kappa B-phospho 65.....</i>	<i>41</i>
2.4.7.2 <i>Cleaved Caspase-3 (Western Blot).....</i>	<i>41</i>
2.4.8 Überlebensversuche.....	42
2.5 Zusammenfassung des experimentellen Protokolls.....	44
2.6 Statistik.....	45
3. ERGEBNISSE.....	46
3.1 Intravitalmikroskopie.....	46
3.1.1 Sinusoidale Perfusion und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	46
3.2 Histopathologie.....	49
3.3 Hepatozelluläre Apoptose.....	49
3.4 Hepatozelluläre Integrität.....	51
3.5 Immunhistochemie.....	52
3.5.1 NFkappaB-p65.....	52
3.6 Plasmaanalyse.....	54

3.7 Überlebensversuche.....	55
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	57
4. DISKUSSION.....	58
4.1 Diskussion von Material und Methoden.....	58
4.1.1 Diskussion des Modells.....	58
4.1.1.1 Tiermodelle zur Pathogenese der Sepsis.....	58
4.1.1.2 Präparation.....	61
4.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken.....	61
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	65
4.2.1 Wirkung von ALP bei Endotoxinämie.....	65
4.2.2 Regulation von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen durch ALP bei Endotoxinämie.....	66
4.2.2.1 Regulation von NFκB.....	66
4.2.2.2 Folgen der Hemmung von NFκB.....	68
4.2.2.3 IL-10 - ein wichtiger Gegenregulator der inflammatorischen Reaktion.....	70
4.2.2.4 Wirkung von D-Galactosamin auf Transkription und Translation.....	71
4.2.3 Auswirkung von ALP auf den apoptotischen Zelltod.....	72
4.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	75
5. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	77
6. HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	79
7. LITERATUR.....	80
8. DANKSAGUNG.....	98
9. LEBENS LAUF.....	100

ZUSAMMENFASSUNG

Beim akuten Leberversagen infolge septischen Schocks kommt der Interaktion von apoptotischem Zelltod und gesteigerter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mit Freisetzung proteolytischer Enzyme eine wesentliche Bedeutung zu. Ziel der vorliegenden *in vivo* Studie war es daher, die antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkung rekombinant hergestellter Antileukoproteinase (ALP), einem physiologischen Inhibitor leukozytärer Serinproteasen, in einem murinen Modell des akuten Leberversagens zu evaluieren.

Zur Induktion eines akuten Leberschadens erhielten weibliche C57BL/6J-Mäuse eine intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid (E.coli LPS, 10 µg/kg KG) und D-Galactosamin (D-GalN, 720 mg/kg KG). Zeitgleich wurden die Tiere intraperitoneal mit 15 mg/kg KG ALP (**G-L/ALP**; n = 6) oder der Vehikellösung (**G-L**; n = 6) behandelt. Tiere ohne Induktion eines Leberschadens erhielten äquivalente Volumina physiologische Kochsalzlösung und dienten als Kontrolle (**KON**; n = 6). Unter Ketamin/Xylazin-Narkose erfolgte 6 h nach Vorbehandlung die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie der Leber. Zusätzliche Tiere wurden nach zeitgleicher Behandlung zur laborchemischen Bestimmung von TNF-α, IL-10 und IL-5 mittels Bioplex Zytokin-Assay entblutet. Lebergewebe dieser Tiere diente dem immunhistochemischen Nachweis von NFκB-p65 sowie der Quantifizierung hepatozellulärer Apoptose mittels TUNEL-Assay und Western Blot Proteinanalyse von Cleaved Caspase-3. In zwei weiteren Serien wurde die Überlebensrate (10-Tage-Überleben; n = 10 je Gruppe) erfasst. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und nachfolgendem Paarvergleich (*p < 0,05 vs. KON; # < 0,05 vs. G-L).

Die *in vivo* Analyse der Leber 6 h nach D-GalN/LPS-Exposition zeigte charakteristische Merkmale des akuten Leberversagens mit intrahepatischer Leukozyten-Akkumulation, Perfusionsversagen, Zell-Apoptose und -Nekrose. Die Applikation von ALP führte zu einer signifikanten Reduktion der venulären Leukozytenadhärenz (Zellen/mm²: KON 19 ± 7; G-L 130 ± 20*; G-L/ALP 69 ± 24^{*#}), allerdings nur zu einer leichten Verbesserung der nutritiven Perfusion (%: KON 90 ± 2; G-L 68 ± 2*; G-L/ALP 73 ± 2*). Die massive hepatozelluläre Apoptose konnte durch Gabe von ALP nur unwesentlich beeinflusst werden (TUNEL-positive

Zellen/mm²: KON 1 ± 1 ; G-L $257 \pm 63^*$; G-L/ALP $204 \pm 66^*$; Cleaved Caspase-3/ β -Aktin x-facher Anstieg: KON $1,0 \pm 0,2$; G-L $6,0 \pm 0,5^*$; G-L/ALP $4,7 \pm 0,1^*$). Interessanterweise führte die Gabe von ALP aber zu einer signifikanten Reduktion der Transaminasen (AST U/l: KON 29 ± 3 ; G-L $208 \pm 84^*$; G-L/ALP $39 \pm 8^\#$) als Zeichen des eingeschränkten nekrotischen Leberschadens, ohne jedoch die 10-Tage-Sterblichkeit der Tiere zu senken. Die immunhistochemische Quantifizierung ergab eine stark erhöhte Anzahl NF κ B-p65-positiver hepatozellulärer Kerne, welche durch Gabe von ALP signifikant reduziert werden konnte (Zellen/mm²: KON $0,1 \pm 0,1$; G-L $232 \pm 99^*$; G-L/ALP $44 \pm 30^\#$). Damit einhergehend waren die Plasmakonzentrationen sowohl von TNF- α als auch IL-10 nach ALP-Gabe signifikant erniedrigt (TNF- α pg/ml: KON 31 ± 5 ; G-L $82 \pm 13^*$; G-L/ALP $38 \pm 4^\#$; IL-10 pg/ml: KON 8 ± 1 ; G-L $74 \pm 26^*$; G-L/ALP $19 \pm 9^\#$). Zusätzliche Applikation von IL-10 in einer weiteren Überlebensstudie konnte die Überlebenszeit zwar verlängern, die Mortalität jedoch nicht signifikant verringern.

Die Applikation von ALP führt im murinen Modell des D-GalN/LPS-induzierten Leberschadens durch Blockade der nukleären Translokation von NF κ B zu einer reduzierten inflammatorischen Antwort, während der Proteasen-Inhibitor im Kontext des apoptotischen Gewebesadens nicht protektiv ist. Daher erscheint ein therapeutischer Ansatz zur Proteasen-Inaktivierung in der Behandlung des akuten septischen Leberschadens nicht zielführend.

ABSTRACT

Increased leukocyte recruitment with release of proteolytic enzymes plays a key role for septic organ damage. The present *in vivo* study was undertaken to evaluate the therapeutic efficacy of antileukoproteinase (ALP), a physiological inhibitor of granulocytic serine proteases, in a murine model of acute liver injury. Female C57BL/6J mice were challenged with D-galactosamine (D-GalN) and E.coli lipopolysaccharide (LPS) followed by administration of saline or ALP. Analysis of the liver by intravital microscopy 6 hours after treatment with D-GalN/LPS revealed characteristic features of acute liver injury, such as marked leukocyte recruitment and perfusion failure, as well as hepatocellular apoptosis and necrosis. Moreover, immunohistochemical analysis of NF κ B-p65 showed that it became increasingly detectable in hepatocellular nuclei after D-GalN/LPS challenge, which was accompanied by a rise of TNF- α and IL-10 plasma levels. ALP treatment markedly reduced intrahepatic leukocyte accumulation, nuclear translocation of NF κ B-p65 as well as plasma levels of TNF- α and IL-10. Moreover, physiologic liver enzyme levels were indicative for the absence of necrotic parenchymal cell death. Nevertheless, ALP-treated animals exhibited an only slightly reduced amount of apoptotic cell death, and ALP was not capable of improving survival rate of D-GalN/LPS-treated mice even after additional application of IL-10. In line with its suppression of NF κ B-dependent proinflammatory pathways, ALP could prevent D-GalN/LPS-associated intrahepatic inflammatory response, but not apoptosis-driven mortality. Thus, a protease-inactivating approach such as delivery of ALP seems to be inadequate in the diseased liver with apoptosis representing the predominant mode of cell death.

1. EINLEITUNG

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition

Die Sepsis - im Volksmund „Blutvergiftung“ genannt - ist eine systemische inflammatorische Reaktion des Körpers, die gegen einen aktiven septischen Prozess im Wirtsorganismus gerichtet ist und eine Freisetzung und Aktivierung endogener inflammatorischer Mediatoren bewirkt.

Man kann zwischen der Bakteriämie, dem SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) und der Sepsis unterscheiden.

Die **Bakteriämie** beschreibt das Vorhandensein von Bakterien in der Blutbahn, ohne eine systemische Reaktion des Körpers auszulösen.

Die **SIRS** ist definiert als das Vorhandensein von mindestens zwei der folgenden Kriterien (Herold, 2005):

1. Temperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$ (bestätigt durch eine rektale, intravasale oder intravesikale Messung)
2. Tachykardie $> 90 \text{ min}^{-1}$
3. Tachypnoe $> 20 \text{ min}^{-1}$
4. $\text{pCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
5. Leukozyten > 12000 oder $< 4000 \mu\text{l}^{-1}$ oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild.

Die **Sepsis** beschreibt eine komplexe systemische Reaktion des Organismus auf eine Infektion und ist wie folgt definiert: Nachweis einer infektiösen Ursache (Bakteriämie) zusammen mit dem Auftreten eines SIRS. In ca. 30% der Fälle kann jedoch mikrobiologisch kein sicherer Infektionsnachweis erfolgen, auch wenn nach klinischen Kriterien eine Infektion wahrscheinlich ist.

Die Sepsis kann über die schwere Sepsis letztendlich zum septischen Schock mit Multiorganversagen führen:

Von einer **schweren Sepsis** spricht man bei Hypoperfusion der Gewebe, welche zu Organdysfunktionen und infolgedessen zu Oligurie, Laktatazidose und Störungen der geistigen Funktionen und/oder zu Hypotension führt (Bone et al., 1997).

Der **septische Schock** beschreibt den Zustand der Sepsis

- mit zusätzlicher Hypotension (<90 mmHg systolischer Blutdruck oder >40 mmHg unter Normaldruck des Patienten), die trotz adäquater Volumentherapie für mindestens eine Stunde anhält oder
- mit Bedarf an Vasopressoren, um den systolischen Blutdruck >90 mmHg oder den mittleren arteriellen Blutdruck ≥ 65 mmHg beizubehalten.

Beim **Multiorganversagen** kommt es schließlich zu einem Ausfall von mehr als einem Organ, so dass eine Intervention notwendig wird, um die Homöostase zu erhalten.

1.1.2 Geschichte

Hugo Schottmüller formulierte bereits 1914 eine erste Definition der Sepsis (Budelmann, 1969): „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“

Nach weiteren Beobachtungen und Erkenntnissen in den 80iger Jahren veröffentlichte Roger C. Bone 1989 eine moderne Definition der Sepsis mit den Worten: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (Balk & Bone, 1989).

1991 wurde von leitenden Mitgliedern der American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) eine Konferenz mit dem Ziel abgehalten, sich auf Definitionen zu einigen, die bei Sepsispatienten Anwendung finden sowie Kliniker und Forscher beim Umgang mit Sepsis und Sepsispatienten unterstützen können. So wurden Definitionen für Sepsis und SIRS zusammen mit detaillierten Beschreibungen der entsprechenden physiologischen Variablen veröffentlicht, um eine Kategorisierung der Patienten in unterschiedliche Schweregrade zu ermöglichen. Auch für schwere Sepsis, septischer Schock, Hypotension und Multiorganversagen wurden Definitionen festgelegt (Bone et al., 1992; ACCP/SCCM Consensus Conference, 1992).

1.1.3 Epidemiologie

Trotz intensiver klinischer und experimenteller Bemühungen, die der Sepsis zugrunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln, ist die Letalität unverändert hoch. Allein in Deutschland treten jährlich über 150.000 Sepsis-Fälle auf, 60.000 Fälle davon enden letal. Damit ist die Sepsis die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz (Reinhart et al., 2006).

Die Behandlung der schweren Sepsis auf Intensivstationen verursacht jährliche Kosten von in etwa 1.77 Billionen Euro, was ca. 30% des Budgets von Intensivstationen ausmacht (Reinhart et al., 2006). Mit zunehmendem Lebensalter, insbesondere ab einem Alter über 75 Jahren, und zunehmender Anzahl zugrunde liegender Komorbiditäten steigen sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität bei der Sepsis (Perl et al., 1995; Angus et al., 2001; Martin et al., 2006).

1.1.4 Ätiologie

Die sechs häufigsten Ursachen für Infektionen von Sepsis-Patienten sind Pneumonien, Sepsis durch Infektion eines intravaskulären Katheters, Infektionen des Blutkreislaufes (inklusive infektiöser Endokarditis), intraabdominelle Infektionen, Urosepsis und chirurgische Wundinfektionen (Calandra et al., 2005). Ein erhöhtes Risiko haben ältere und immunsupprimierte Patienten (Volk et al., 1996).

1.1.5 Pathophysiologie

1.1.5.1 Allgemeine Pathophysiologie

Das Überleben des Organismus ist davon abhängig, Pathogene erkennen zu können und schnell und adäquat auf diese zu reagieren. Diese Verteidigungsmechanismen sind angeboren und führen bei Vorhandensein bestimmter biochemischer Strukturen, die auf der Oberfläche von mikrobiellen Organismen vorhanden sind, durch bestimmte Erkennungsmechanismen zu einer prompten Immunantwort. Das angeborene Immunsystem ist unspezifisch und besteht aus Neutrophilen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen, welche eingedrungene Infektionserreger auch ohne Einfluss des adaptiven Immunsystems eradizieren können. Wenn

es nötig wird, können die Zellen des angeborenen Immunsystems auch Zytokine und weitere induzierende Moleküle freisetzen, welche durch Aktivierung von T- und B-Zellen das adaptive Immunsystem aktivieren (Das, 2000).

Eine wichtige Rolle für den Verlauf der Sepsis spielen u.a. die Zahl, Pathogenität, Virulenz oder Art des Erregers. Hauptauschlaggebend ist jedoch das Ausmaß der Reaktion des Patienten auf die auslösende Noxe (Volk et al, 1996; Bone et al, 1997).

Zunächst stellt die lokale Entzündungsreaktion auf einen exogenen Stimulus eine sinnvolle Abwehrreaktion auf den pathogenen Auslöser und somit eine physiologische Schutzfunktion des Körpers dar. Die Entzündungsreaktion ist engmaschig geregelt, aber bei Verlust der lokalen Kontrolle dieser Reaktion oder bei Hyperinflammation kommt es zu einer unkontrollierten Reaktion und zum klinischen Bild einer systemischen Antwort bzw. zum SIRS, so dass nicht nur die für die Immunantwort verantwortlichen Pathogene eliminiert sondern auch autodestruktive Schädigungen körpereigener Zell- und Organsysteme hervorgerufen werden (Sharif et al., 2007). Gleichzeitig werden Kompensationsmechanismen aktiviert, welche für den Verlauf des SIRS entscheidend sind, denn solange die Immunantwort angemessen ist und die Entzündungsreaktion nicht exazerbiert bzw. lokalisiert bleibt, kommt es zur „restitutio ad integrum“.

Neben der proinflammatorischen findet auch eine antiinflammatorische Reaktion statt. Ziel dieser antiinflammatorischen Reaktion ist es, die Synthese proinflammatorischer Zytokine einzuschränken, ihre Effekte zu balancieren und die Homöostase wiederherzustellen (Bone et al., 1997). Eine Überproduktion proinflammatorischer Zytokine oder reaktiver Sauerstoffspezies führt jedoch zu einer Störung des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalen und resultiert in einer verminderten Reaktionsfähigkeit auf Grund einer Depression der zellulären Immunität des Immunsystems. Dies kann zum Schock mit der Folge des Multi-Organ-Versagens (MODS - Multiple Organ Distress Syndrome) führen, welches nur mit bleibenden Defekten zur Ausheilung kommt und nicht selten sogar mit einem Tode des Patienten endet (Davies et al., 1997; Dhainaut et al., 2001; Sanlioglu et al., 2001). Daraus folgt, dass das Ergebnis der inflammatorischen Antwort des Wirtsorganismus auf die Endotoxämie von einem komplexen Zusammenspiel zwischen positiven und negativen Einflüssen abhängig ist.

1.1.5.2 *Spezielle Pathophysiologie*

In der Frühphase der Sepsis kommt es durch Invasion von Bakterien (exogene Stimulation, z.B. durch Lipopolysaccharid (LPS)) oder durch ein Gewebe-Trauma (endogene Stimulation) zur Aktivierung von Inflammation (Komplementsystem) und Koagulation (Gerinnung) (Nitescu et al., 2007).

Durch die Bindung von bakteriellen Zellwandbestandteilen (Endotoxine, z.B. Lipopolysaccharid, Peptidoglykan (PG)) an bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen, so genannte „pattern recognition receptors“ (PRRs), wie Toll-like Rezeptor-4 (TLR)-4 und CD 14, kommt es zur Erkennung dieser bakteriellen Zellwandbestandteile und somit über eine Vielzahl von Signaltransduktions-Kaskaden zur Initiation der septischen Immunantwort. Diese erfolgt zunächst über die Freisetzung von NFκB („Nuclear Factor kappa B“), welcher in seiner inaktiven Form in einem Komplex mit IκB („Inhibitory kappa B“) vorliegt und ein wichtiges intrazelluläres Protein ist. Daraufhin transloziert NFκB in den Zellkern und führt dort zur Transkription sowohl proinflammatorischer (z.B. Tumor Nekrose Faktor (TNF)-α, Interleukin (IL-) 1, IL-6, Interferon-gamma (IFN-γ)) als auch antiinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-10, IL-1-Rezeptor-Antagonist, Transforming Growth Factor (TGF)-β) sowie verschiedener Adhäsionsmoleküle (Holmes et al., 2003). Einige proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF-α und IL-1 können wiederum NFκB aktivieren, so dass es zu einer weiteren Verstärkung der inflammatorischen Antwort kommt (Abraham, 2003).

Die proinflammatorischen Zytokine aktivieren Leukozyten, so dass es zunächst zu einer losen Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen bzw. zwischen leukozytären (L-Selektin) und endothelialen (P- und E-Selektin) Rezeptoren kommt. Diese ist als „Slow Rolling“ in postkapillären Venolen beobachtbar. Daraufhin wird die Expression von Zelladhäsionsmolekülen (α -Integrin (CD-11) und β_2 -Integrin (CD-18)) auf Leukozyten gefördert, welche für die sekundäre Leukozyteninteraktion mit dem mikrovaskulären Endothel verantwortlich sind.

Weiterhin kommt es zur Förderung der Expression von Rezeptoren für die Integrine auf Endothelzellen, wie „intracellular adhesion molecule“ (ICAM-1) und „vascular cell adhesion molecule“ (VCAM-1), welche eine feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel und somit ihre Transmigration durch die Zellwand bzw. ihre Emigration ins umliegende Gewebe erlauben.

Die Aktivierung von Endothelzellen bewirkt außerdem die Freisetzung von Stickoxid (NO). Durch Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Leukozyten und der Reaktion dieser Sauerstoffradikale mit NO kommt es zur Bildung von Peroxynitrit und somit zur Verstärkung des Gewebeschadens (Bauer, 2004).

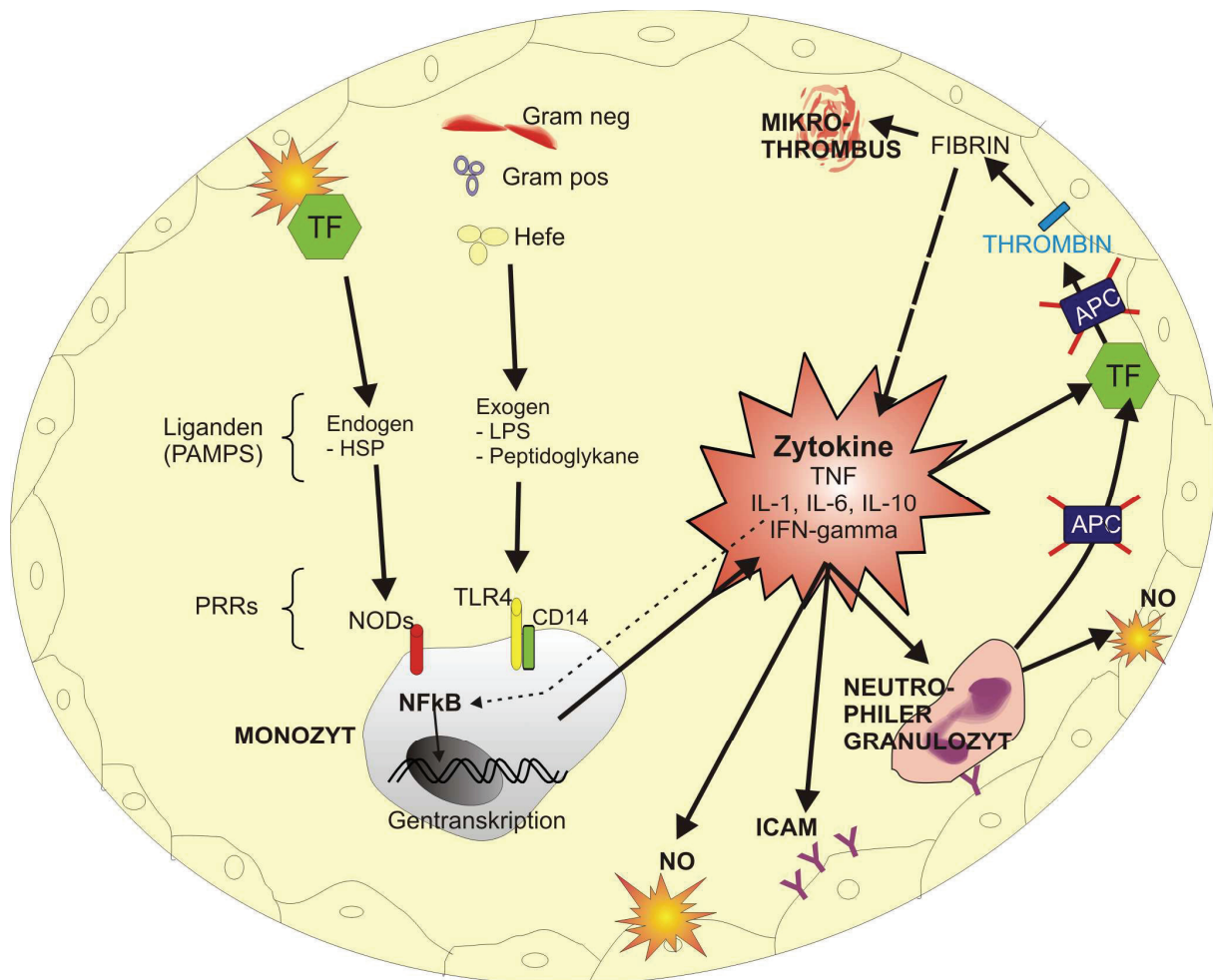


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Vorgänge bei der angeborenen inflammatorischen Immunantwort auf einen Infektionserreger und Gewebeschaden.

(neg = negativ; pos = positiv; TF = Tissue Factor; PAMPS = Pathogen Associated Microbial Patterns; HSP = Heat Shock Protein; LPS = Lipopolysaccharid; NOD = Nucleotide-binding Oligomerization Domain; TLR4 = Toll-Like Rezeptor 4; APC = Aktiviertes Protein C.)

(Modifiziert nach <http://www.chestjournal.org/cgi/content/full/124/3/1103/F1>.)

Die feste Adhäsion von Neutrophilen an die Gefäßwand bewirkt die Freisetzung von „Tissue Factor“ (TF). Dessen Freisetzung wird auch durch Aktivierung von Monozyten und Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine stimuliert und führt zur Aktivierung des Gerinnungssystems mit Bildung von Mikrothromben. Das Aktivierte Protein C (APC) kann

diesen Vorgang hemmen. Schließlich kann es bei maximaler Aktivierung des Gerinnungssystems zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) mit Verbrauch der Gerinnungsfaktoren (Verbrauchskoagulopathie) kommen. Dabei entstehen Organeinblutungen und Mikroembolien (Holmes et al., 2003; Bauer, 2004).

Die proinflammatorischen Mediatoren haben daher zusammenfassend folgende Effekte (Jaeschke & Smith, 1997; Holmes et al., 2003):

- Erhöhung der Gefäßpermeabilität, daraus folgende Gefäßleakage und Ödementstehung;
- Kontraktion der Gefäßmuskulatur durch eine Imbalance vasokonstriktorischer (z.B. Endothelin-1) und vasodilatatorischer (z.B. Stickoxid) Faktoren und Reduktion der Verformbarkeit der neutrophilen Leukozyten mit Erhöhung des Risikos der Sequestration in der Mikrostrombahn von Organen;
- Förderung der Phagozytose, der Produktion von Sauerstoffradikalen und von Entzündungsmediatoren durch Makrophagen (führt bei überschießender Reaktion zu Gewebsschädigung);
- Förderung und Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und dadurch vermehrte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.

Wie bereits erwähnt, kann das Primärziel der Elimination von Bakterien erreicht werden, solange diese Mechanismen nicht überschießend funktionieren. Normalerweise wird die überschießende Produktion und Aktivität proinflammatorischer Zytokine durch die Freisetzung körpereigener antiinflammatorischer Faktoren balanciert und somit verhindert. Bei fehlender Aktivität antiinflammatorischer Zytokine besteht eine viel höhere Anfälligkeit für eine Endotoxinämie (Volk et al., 1996).

Der initialen hyperinflammatorischen Phase der Sepsis folgt eine hypoinflammatorische Phase der Immunsuppression. Es setzt eine Refraktärphase ein, in der die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten sowie die Antigen-präsentierende Aktivität stark reduziert sind, die Fähigkeit antiinflammatorische Zytokine (IL-10, TGF-beta und IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA)) zu produzieren aber nach wie vor vorhanden ist (Randow et al., 1995; Pugin, 2007). Eine wichtige Ursache der Immunsuppression in einer späteren Phase der Sepsis ist die umfangreiche Apoptose von Lymphozyten (Hotchkiss et al., 2005).

Gleichzeitig zirkulieren neutrophile Granulozyten länger im Blut und verursachen eine Zunahme des Gewebeschadens durch die Produktion von Sauerstoffradikalen.

Bei exzessiver Reaktion des Immunsystems kann es weiterhin dazu kommen, dass die Phase der Immundepression verlängert und stärker ausgeprägt verläuft, so dass das angeborene Immunsystem nur noch eine eingeschränkte oder sogar ganz aufgehobene Abwehrfunktion aufweist. Dies führt letztendlich dazu, dass der Organismus nicht mehr adäquat auf Infektionen reagieren und diese abwehren kann, was schließlich im septischen Multiorganversagen endet.

1.1.6 Die Bedeutung des akuten Leberversagens bei Sepsis

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers. Hier finden unter anderem die Synthese von Albumin und der Gerinnungsfaktoren sowie die Biotransformation statt. Sie gehört zu den entscheidenden Organen der Abwehrreaktion bei Sepsis.

Die Kupffer-Zellen der Leber phagozytieren Bakterien, inaktivieren schädliche bakterielle Produkte, produzieren inflammatorische Mediatoren und führen zu einer pathologischen Aktivierung des Gerinnungssystems. Die aktivierten Kupffer-Zellen können andererseits auch durch eine übersteigerte Freisetzung von Chemokinen, welche neutrophile Granulozyten anlocken und diese aktivieren, zu einer Leberdysfunktion führen. In neutrophilen Granulozyten werden, wie oben bereits beschrieben, Adhäsionsmoleküle und Tissue Faktor hochreguliert sowie weitere Kupffer-Zellen aktiviert. Es kommt letztendlich zu Mikrozirkulationsstörungen, Leberschäden, der Ausschwemmung von Endotoxinen und schließlich zum Multiorganversagen (Dhainaut et al., 2001).

Bei Patienten mit Sepsis und Multiorganversagen ist das Leberversagen wegen dem damit einher gehenden Verlust der Synthese-, Exkretions- und Entgiftungsfunktion von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf und die Prognose der Patienten, denn es geht mit einer hohen Mortalität einher (Riordan & Williams, 2000; Schattenberg et al., 2006; Novotny et al., 2007a). Wegweisende klinische Symptome des akuten Leberversagens sind die hepatische Enzephalopathie, Ikterus und die Störung der Blutgerinnung. Diagnostische Kriterien sind dabei ein Anstieg des Serumbilirubins auf über 2 mg/dl und eine Erhöhung der Transaminasen über das 2-fache des Normalwertes (Müller-Werdan, 2003).

Zur kausalen Therapie des akuten Leberversagens stehen folgende Möglichkeiten zur Verfügung: die Gabe von Albumin und Terlipressin, sowie artifizielle Systeme zum temporären Leberersatz durch Unterstützung der Entgiftungsfunktion, wie Hämodialyse, Hämofiltration, Austauschtransfusion, Plasmapherese, Hämooperfusion oder Plasmaperfusion für die mechanische Elimination von Toxinen (Mitzner et al., 2002). Diese Verfahren erwiesen sich jedoch größtenteils als ineffizient. Das MARS-Verfahren (Molecular adsorbent recycling system) ist eine relativ neue Möglichkeit zur Detoxifikation mittels Albumindialyse (Mitzner et al., 2001; Santoro et al., 2007). Trotz zunächst vielversprechender Ergebnisse erbrachte auch die MARS-Therapie bei Patienten mit Multiorganversagen und Sepsis eher enttäuschende Resultate (Wilmer et al., 2002; Rittler et al., 2004). Beim akuten Leberversagen mit erwarteter Letalität >80% bleibt daher die Lebertransplantation das Therapieverfahren der Wahl (Bauer et al., 2004; Rozga, 2006).

Auf Grund der großen Heterogenität des betroffenen Patientenkontexts sowie der sehr komplexen Leberfunktionen, die bei einer Dysfunktion ersetzt werden müssen, ist es äußerst schwer eine effektive Leberunterstützungstechnologie zu entwickeln (Rozga, 2006). Trotz alledem werden weiterhin neue Therapieverfahren entwickelt, wie bioartifizelle Systeme aus isolierten Hepatozyten, welche bisher jedoch nicht klinisch einsetzbar sind (Santoro et al., 2007).

Zusammenfassend sind für das akute Leberversagen, bis auf die Möglichkeit einer Lebertransplantation, bislang keine effizienten kausalen Therapieverfahren etabliert. Da es zu wenig Spenderorgane gibt, stellt die Behandlung des akuten Leberversagens nach wie vor ein großes Problem dar. Daher ist es dringend erforderlich, weitere Forschungsanstrengungen zur Entwicklung sowohl kausaler als auch adjuvanter Therapieoptionen durchzuführen.

1.1.7 Symptome und Diagnose

Kriterien, die auf eine Sepsis hinweisen, sind neben Fieber und Schüttelfrost Hypothermie, Atemnot, eine Erhöhung der Herzfrequenz, niedriger Blutdruck sowie Leukozytose oder Linksverschiebung im Differentialblutbild bzw. Neutropenie. Die Frühsymptome der Sepsis sind daher sehr unspezifisch, so dass diese beispielsweise von Symptomen eines grippalen

Infektes kaum zu unterscheiden sind. Daher wird die Sepsis häufig erst in einem späteren, lebensbedrohlichen Stadium erkannt.

Um eine sichere Diagnose stellen zu können, ist die Abnahme von Blutkulturen möglichst frühzeitig vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie nötig. Bei Patienten, die bereits mit Antibiotika behandelt werden, sollten die Blutkulturen kurz vor der nächsten Einnahme abgenommen werden.

Procalcitonin ist ein relativ zuverlässiger Marker der systemischen inflammatorischen Antwort auf Infektionen und kann zum Ausschluss bzw. zur Sicherung der Diagnose führen (Müller et al., 2000; Balci et al., 2003; Novotny et al., 2007b). Procalcitonin, ein Polypeptid, ist die Vorstufe des Hormons Calcitonin, welches normalerweise in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse produziert wird. Während schweren systemischen Infektionen wird dieses Polypeptid aus noch ungeklärten Gründen auch von extrathyreoidalen Zellen produziert (Reingardiene, 2004). Bei einer Procalcitoninkonzentration $<0,5$ ng/ml im Serum ist eine Sepsis unwahrscheinlich, bei Werten $\geq 2,0$ ng/ml sehr wahrscheinlich. Außerdem ist Procalcitonin ein guter Indikator für den Schweregrad des Multiorganversagens in SIRS-Patienten (Yukioka et al., 2001). Dabei muss man aber beachten, dass ein operatives Trauma oder auch andere Ursachen zu einer transitorischen Erhöhung der Procalcitoninkonzentration im Serum führen können (Meisner et al., 1998).

1.1.8 Therapie

Die erfolgreiche Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks ist trotz der Explosion des Kenntnisstandes der septischen Inflammationsantwort nach wie vor eine große Herausforderung auf Intensivstationen. Die Anwendung einer angemessenen Therapie und ein frühestmöglicher Beginn der Behandlung in den ersten Stunden nach der Diagnose haben entscheidenden Einfluss auf das Outcome septischer Patienten in Bezug auf die Reduktion der Morbidität und Mortalität (Adukauskiene et al., 2006). Weiterhin spielen der Grad der Störung der physiologischen Funktionen, der Organdysfunktion sowie die zugrunde liegende Erkrankung und deren mikrobiologische Ursache eine Rolle für den Verlauf und die Auswirkung der Sepsis (Angus & Wax, 2001).

Entscheidend sind die vollständige chirurgische Entfernung des Infektionsherdes, sowie eine möglichst frühzeitige Diagnose, um rechtzeitig eingreifen zu können.

Die Therapie der Sepsis basiert auf den folgenden drei Säulen (Dellinger et al., 2004):

1) Kausale Therapie:

- die Sanierung des Fokus (z.B. chirurgische Entfernung von Implantaten, Inzision bzw. CT-gestützte Drainage von Abszessen, Wunderöffnung und Nekrotomie)
- schnellstmöglicher Beginn einer hochdosierten Antibiotikatherapie nach Antibiogramm (für ca. 7-10 Tage). Alle 48 bis 72 Stunden sollte eine Überprüfung der Effektivität des verwendeten Antibiotikums erfolgen, um das antimikrobielle Spektrum zu verengen und Resistenzentwicklungen entgegen zu wirken.

2) Supportive/unterstützende Therapie:

- hämodynamische Stabilisierung: Kontrolle der Vitalparameter, Volumensubstitution mit kristallinen oder kolloidalen Lösungen.
- bei eingeschränktem Herzzeitvolumen trotz Volumentherapie: Gabe von Dopamin als Katecholamin der ersten Wahl und bei hypotensiven Patienten zusätzliche Gabe eines Vasopressors.
- Airway-Management und Beatmung: Indikationen sind das Vorliegen einer schweren Tachypnoe (>35 pro Minute), einer muskulären Erschöpfung (Einsatz der Atemhilfsmuskulatur), einer eingeschränkten Vigilanz oder eines Sättigungsabfalls ≤ 90 % trotz Sauerstoffinsufflation.
- Zielwerte der Therapie sind das Erreichen eines arteriellen Mitteldruckes von 65-90 mmHg, eines Zentralvenendruckes (ZVD) von 8-12 mmHg, einer zentralvenösen Sauerstoffsättigung von mindestens 70 % und einer Urinausscheidung von mindestens 0,5 ml pro kg Körpergewicht in der Stunde.

3) Adjunktive Therapie:

- die Applikation von Glukokortikoiden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Diagnosestellung eines katecholaminpflichtigen septischen Schocks: niedrig dosiertes Hydrocortison, ein natürliches Hormon der Nebenniere, in einer Dosierung von 200-300 mg pro Tag als Bolus oder als Dauerinfusion, wobei die kontinuierliche Gabe zur Vermeidung einer Hyperglykämie bevorzugt werden sollte (Chadda & Annane, 2002).
- das Verabreichen von rekombinant hergestelltem aktiviertem Protein C (Drotrecogin alfa) innerhalb von 48 Stunden nach Diagnosestellung einer Sepsis und bei zusätzlichem Vorliegen von mindestens zwei Organversagen: Drotrecogin alfa, ein

Hemmstoff der bei Sepsis auftretenden Mikrothrombosierung und Aktivator der Fibrinolyse in einer Dosis von 24 µg pro kg Körpergewicht in der Stunde über einen Zeitraum von vier Tagen (Bernard et al., 2001; Lehmann et al., 2006).

4) Weitere unterstützende Therapiemaßnahmen:

- Thromboseprophylaxe mit unfraktioniertem oder niedermolekularem Heparin
- Enterale, ggf. parenterale Ernährung und metabolische Kontrolle
- Blutzuckerkontrolle und intensivierete Insulintherapie (Schwellenwert von <150 mg/dl (8,3 mmol/l))
- Ulcusprophylaxe mit Histamin-2-Rezeptorantagonisten (z.B. Ranitidin)
- Nierenersatztherapie bei Patienten mit akutem Nierenversagen
- Verabreichen von Erythrozytenkonzentraten bei Abfall des Hb-Wertes unter 7,0 g/dl (4,4 mmol/l)
- Sedation und Analgesie.

1.2 Endotoxinämiemodell

1.2.1 D-Galactosamin

Zur experimentellen Untersuchung des akuten Leberschadens wurden in diesem Experiment Mäuse mit einer Kombination aus Lipopolysaccharid (LPS) und D-Galactosamin (D-GalN) vorbehandelt, welches ein weit verbreitetes Modell der Leberschädigung repräsentiert.

D-GalN ist ein häufig verwendetes Mittel zur Sensitivierung von Ratten und Mäusen gegenüber LPS, da Nagetiere bekanntlich um etwa das 1000-fache weniger empfindlich auf LPS reagieren als Menschen. Es ist ein Aminozucker, welches ausschließlich in der Leber metabolisiert wird und schon ca. dreißig Minuten nach Applikation zu einer selektiven Depletion von Uridinnukleotiden mit nachfolgender schwerer Transkriptions- und Translationshemmung und somit zu einer Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber LPS führt. Die alleinige Applikation von D-GalN wirkt jedoch kaum toxisch. Erst in Kombination mit LPS verursacht es schwere Leberschäden (Leist et al., 1995).

Die LPS-Toxizität in D-GalN-sensibilisierten Mäusen wird durch Freisetzung von TNF- α ausgelöst. Somit verursacht LPS TNF-vermittelt hepatozelluläre Apoptose (Freudenberg & Galanos, 1991; Leist et al., 1995). Eine Studie hat weiterhin an D-GalN-sensibilisierten

Mäusen nach Verabreichen von TNF- α den wichtigen/ausschlaggebenden Schritt des nukleären Transports von NF κ B, ferner den Ort und den Zeitraum bis zur Induktion hepatozellulärer Apoptose durch diesen Transkriptionsfaktor sowie seine anschließende Hemmung beschrieben (Tapalaga et al., 2002): Durch Gabe von TNF- α und LPS kommt es zur Aktivierung von NF κ B, welches daraufhin in den Nukleus transloziert und dort die Transkription verschiedener, unter anderem Apoptose-fördernder, Zytokine induziert. Nach ca. 4,5 Stunden kommt es teilweise zu einem Rücktransport von NF κ B ins Zytoplasma und somit zur Hemmung dieses Faktors, während etwa 30% des NF κ B-Anteils im Nukleus verbleiben.

1.2.2 Lipopolysaccharid

LPS ist ein Endotoxin, welches sich auf der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien befindet und entscheidend an der Entwicklung des Leberversagens und des Multiorganversagens durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α beteiligt ist (Bohlinger et al., 1996).

LPS ist ein hitzestabiles, amphiphiles Glykolipid, das aus einem hydrophoben Lipidanteil (sog. Lipid A) und einer kovalent gebundenen hydrophilen Polysaccharidregion besteht. Es bildet eine für die Stabilität der Bakterienzelle essentielle Permeabilitätsbarriere.

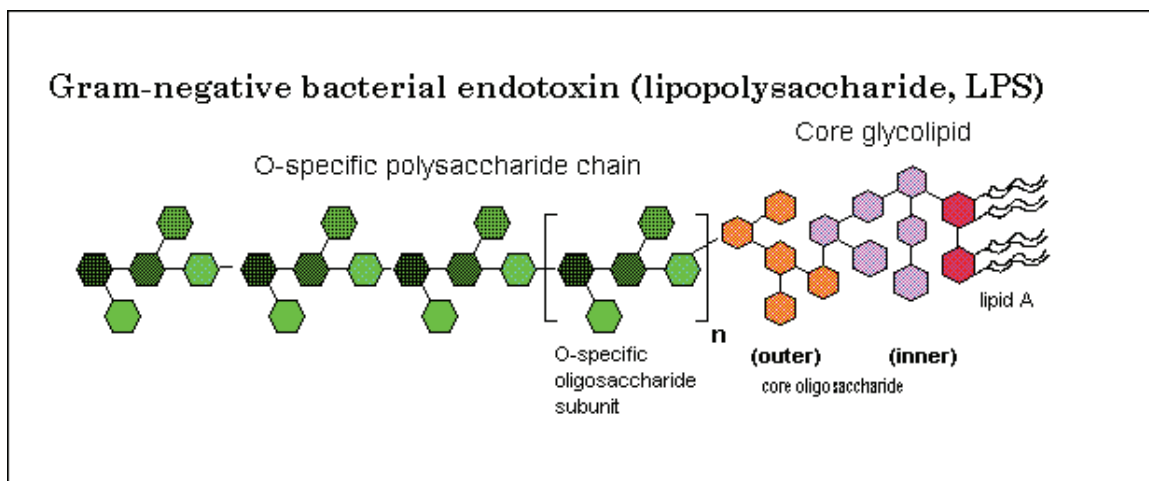


Abb. 2: Strukturformel von LPS.

(Quelle: <http://freespace.virgin.net/r.barclay/lpstyl01.gif>)

Der Lipid A-Anteil bildet das entscheidende Zentrum zur Stimulation des Immunsystems (Alexander et al., 2001).

Das Lipopolysaccharid bindende Protein (LBP) ist ein in der Leber produziertes Glykoprotein. Es bindet an die Lipid A-Region von LPS, so dass ein LBP/LPS-Komplex entsteht, welcher daraufhin an CD14 und Toll-like receptor 4 (TLR4) bindet. CD14 ist ein Glykoprotein, welches hauptsächlich auf den Oberflächen von mononukleären Zellen und Makrophagen exprimiert wird (Pugin et al., 1993; Kirschning & Bauer, 2001).

Die Bindung des LBP/LPS-Komplexes an CD14 und TLR4 aktiviert die Produktion inflammatorischer Zytokine und führt somit zur Aktivierung der Immunreaktion. Dies geschieht über verschiedene Signalmoleküle (unter anderem MyD88, IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK), TNF-Rezeptor assoziierter Faktor (TRAF6)) und I κ B Kinase, welche den Abbau von I κ B und somit die Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Nukleus bewirken. Hierbei werden Monozyten, Makrophagen und Neutrophile stimuliert, immunregulatorische und proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α und IL-1 zu produzieren, wodurch die Kaskade, die zum endotoxischen Schock führen kann, in Gang gesetzt wird (Ulevitch & Tobias, 1995; Nakamura et al., 2003).

1.3 Tumor Nekrose Faktor- α

TNF- α , ein proinflammatorisches Zytokin, hat diverse Wirkungen auf Leukozyten und Leberzellen, die die Inflammation fördern. Daneben kann TNF- α durch die Zelltod-Domäne („death domain“) des Rezeptors TNF-R1 Apoptose induzieren (Tartaglia et al., 1993). Hepatozelluläre Apoptose ist ein wichtiges Merkmal des akuten Leberversagens und fungiert gleichzeitig als Signal für Leukozytenmigration und dessen Angriff auf die Parenchymzellen (Jaeschke et al., 1998; Eipel et al., 2004), wodurch eine weitere Verstärkung der leukozytären Inflammationsreaktion und schließlich der Zelltod in Gang gesetzt wird. Es wurde beschrieben, dass leukozytenabhängige Serinproteasen wie beispielsweise Neutrophilen-Elastase und Cathepsin, einen erheblichen Gewebeschaden verursachen können (Jochum et al., 1994; Jaeschke & Smith, 1997), wohingegen eine Blockade dieser proteolytischen Enzyme zu einer deutlichen Abschwächung des parenchymalen Gewebeschadens führt (Welbourn et al., 1991; Moraes et al., 2006).

1.4 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches als wichtiger Faktor bei der Beendigung der Sepsis-Reaktion angesehen wird (Marchant et al., 1994). Es ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kD, das bei der Stimulation der Immunantwort durch Makrophagen, Monozyten sowie Subpopulationen von T-Helferzellen und B-Zellen produziert wird. Wie anhand von in vitro Versuchen beobachtet werden konnte, hat dieses Protein viele Funktionen, wie zum Beispiel die Hemmung der Produktion von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 sowie von Monozyten-stimulierenden Zytokinen wie IFN γ . Somit besitzt IL-10 indirekt eine hemmende Wirkung auf das inflammatorische Potential der Monozyten bzw. Makrophagen (Randow et al., 1995).

Weiterhin wurde in einem Mausmodell durch exogene Applikation von IL-10 vor allem die Produktion von TNF- α und IL-1 und somit die Entwicklung eines septischen Schocks unterdrückt, während die Gabe neutralisierender anti-IL-10-Antikörper die Mortalität durch Endotoxinämie erhöhte (de Waal Malefyt et al., 1991; Howard et al., 1993). Durch IL-10 wird der Abbau von I κ B α mittels Unterdrückung der Aktivität der IKK (I κ B-Kinase) gehemmt und damit die Bindung von NF κ B an die DNA verhindert. Dadurch wird die Aktivierung von NF κ B und infolgedessen die Freisetzung von TNF- α unterdrückt (Ward & Lentsch, 2002).

1.5 Antileukoproteinase

Die Antileukoproteinase (ALP) oder auch „Secretory Leukoprotease Inhibitor“ (SLPI) ist ein nicht-glykosyliertes, einsträngiges, säurestabiles, zysteinreiches Protein, welches aus insgesamt 107 Aminosäuren zusammengesetzt ist: es besteht aus zwei Domänen mit jeweils 53 und 54 Aminosäuren, welche durch 8 Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und besitzt ein Molekulargewicht von 11,7 kDa (Thompson & Ohlsson, 1986).

Die Tertiärstruktur dieses Proteins ähnelt der Form eines Boomerangs, wobei jeder Arm eine Domäne trägt (Grutter et al., 1988).

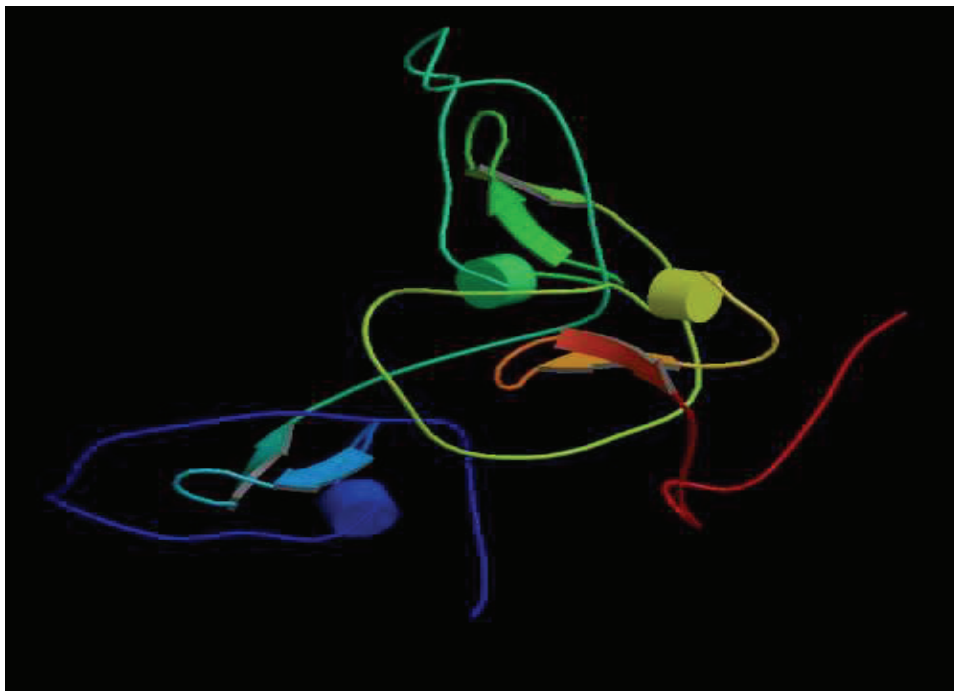


Abb. 3: Tertiärstruktur der Antileukoproteinase.

(Quelle: <http://pir.georgetown.edu/pirwww/images/pdb/1TWPx500c.jpg>)

Schon 1972 isolierten Hochstrasser et al. erstmals ALP aus humanen Bronchialsekreten (Hochstrasser et al., 1972).

ALP wird von Makrophagen, Neutrophilen, Epithelzellen sowie in β -Zellen des Pankreas exprimiert und zirkuliert im Blut. Wie der Name schon sagt, ist ALP ein physiologischer Inhibitor leukozytärer Serinproteasen wie Elastase, Cathepsin G sowie von Pankreasenzymen wie Trypsin, Chymotrypsin und Pankreaselastase (Nystrom et al., 1999; Taggart et al., 2002). ALP wurde in vielen Körpersekreten nachgewiesen, unter anderem in Speichel (Ohlsson et al., 1984), im Zervix uteri-Sekret der Frau (Wallner & Fritz, 1974), in der Samenflüssigkeit

des Mannes (Ohlsson et al., 1995), in Nasen- und Bronchialsekret (Hochstrasser et al., 1972; Westin et al., 1994), in Tränenflüssigkeit und in Muttermilch (Franken et al., 1989).

Respirationstrakt	Nase
	Bronchien
	Bronchioli terminales
	Bronchioli respiratorii
	Ductus alveolares
	Knorpel
Mittelohr	
Verdauungstrakt	Glandula parotis
	Glandula submandibularis
	Von Ebner Drüsen
	Submuköse Drüsen des Ösophagus
Genital- und Harntrakt	Samenbläschen
	Zervikalkrypten
Exokrine Drüsen	Glandula lacrimalis

Tabelle 1: Übersicht über das Vorkommen von ALP in verschiedenen humanen Geweben.

Die C-terminale Domäne des Proteins beinhaltet die inhibitorische Region für Proteasen (Eisenberg et al., 1990). Bei fehlender Aktivität von Elastase und Cathepsin G kommt es zu einer Resistenz gegenüber LPS-vermitteltem endotoxämischen Schock, was deutlich macht, dass ALP während der Inflammation eine wichtige Rolle beim Schutz des Gewebes vor der Wirkung von Proteasen spielt (Tkalcevic et al., 2000).

ALP wird in vielen unterschiedlichen Karzinomarten (Garver et al., 1994) sowie in HIV-Typ 1-infizierten Patienten verstärkt exprimiert und besitzt gleichzeitig anti-HIV-1 Effekte (Wahl et al., 1997; Baqui et al., 1999).

Außerdem sind ALP-Konzentrationen im Serum und im Epithel des respiratorischen Traktes bei inflammatorischen Lungenerkrankungen (z.B. Pneumonien) erhöht (Kida et al., 1992; Maruyama et al., 1994).

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Serinproteasen bewirken in der Lunge die Erzeugung des inflammatorischen Mediators C5a, dessen Produktion die Aktivität von Neutrophilen erhöht und somit auch den begleitenden Lungenschaden intensiviert. Zusammen mit anderen Faktoren manifestiert sich die antiinflammatorische Wirkung von ALP durch eine Senkung der C5a-abhängigen chemotaktischen Aktivität (Gipson et al., 1999). Dies erfolgt über die

Hemmung der MMP-Produktion durch Monozyten und Makrophagen mittels Reduktion der Prostaglandin E₂-Synthese (Zhang et al., 1997).

ALP kann aufgrund seines geringen molekularen Gewichtes und seiner kationischen Eigenschaften die Blutzirkulation verlassen und sich in unterschiedlichen Geweben, z.B. in Knorpel, anreichern (Bohm et al., 1992).

Weiterhin hat ALP einen hemmenden Effekt auf die durch Immunkomplexe induzierte Aktivierung von Integrinen in Leukozyten, welche eine wichtige Rolle bei der Extravasation der Leukozyten ins Gewebe spielen. Außerdem wurde gezeigt, dass ALP die Inzidenz und den Schweregrad von Arthritiden senkt (Sehnert et al., 2004).

Zusätzlich zu den antiproteolytischen Eigenschaften besitzt ALP eine Vielzahl antiinflammatorischer Wirkungen auf Makrophagen und neutrophilen Zellen, welche bei inflammatorischer Stimulation durch LPS hochreguliert werden (Sehnert et al., 2004). In diesem Zusammenhang ist beschrieben worden, dass ALP in vitro die Aktivierung von Makrophagen durch LPS hemmt (Yang et al., 2005).

Daher wurde hier in einem Endotoxinmodell durch Gabe von LPS und D-GalN untersucht, ob ALP wirkungsvoll die Entwicklung eines Leberschadens vorbeugen und die Letalität verhindern kann.

1.6 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Ziel dieser experimentellen Studie war es, mit Hilfe des etablierten Modells der Intravitalmikroskopie zu untersuchen, ob und inwieweit Antileukoproteinase in einem *in vivo* Modell des akuten Leberversagens eine Reduktion der durch Endotoxin verursachten Mikrozirkulationsstörungen und Parenchymschäden bewirken kann. Zusätzlich wurden histologische, immunhistochemische, laborchemische und molekularbiologische Verfahren durchgeführt, um die Untersuchung zu erweitern und zu vervollständigen.

Folgende wesentliche Fragestellungen wurden untersucht:

- Besitzt die Applikation von ALP einen positiven Effekt auf die nutritive Perfusion und verursacht sie eine Herabsetzung der Leukozytenakkumulation in der endotoxingeschädigten Leber?
- Hat die Vorbehandlung mit ALP eine Wirkung auf den NF κ B-Signalweg und wenn ja, welchen?
- Kann ALP den TNF- α induzierten Zellschaden, der bei Endotoxinämie entsteht, minimieren?
- Wie verändert sich nachfolgend der Zytokinspiegel bei D-GalN/LPS-Exposition durch Gabe von ALP?
- Wie wirkt sich ALP auf die zelluläre Integrität aus? Kann sie die durch D-GalN/LPS ausgelöste hohe Apoptose- und Nekroserate reduzieren und wenn ja, wie wirkt sich dies auf die Mortalität der Versuchstiere aus?
- Könnte man ALP in Zukunft als therapeutisches Mittel gegen septisches Leberversagen in Betracht ziehen?

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden weibliche, 8 bis 10 Wochen alte C57BL/6J Mäuse mit einem Körpergewicht (KG) von ca. 20g verwendet. Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River Labors, Sulzfeld, Deutschland) und wurden vor Beginn der Untersuchungen für einige Tage in einem klimatisierten Raum (Temperatur 22-24°C, Feuchtigkeit ~60%) der Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum gehalten.

Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz und der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt.

2.2 Modell

2.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

Vor Durchführung der Experimente wurden die Tiere intraperitoneal (ip.) mit einer Kombinationsnarkose aus 75 mg/kg KG Ketamin (Ketamin®, Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompus®, Bayer Vital GmbH, Bayer HealthCare, Deutschland) anästhesiert. Nach der Entfernung der Haare an Hals und Bauch mittels Elektrorasur (AESCULAP® Favorita II, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) wurden die Tiere in Rückenlage auf einem Operationstisch mit integrierter Heizplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland) gelegt. Diese ermöglichte die Konstanthaltung der Körpertemperatur zwischen 36°C und 37°C über den gesamten Versuchszeitraum.

Nach paratrachealer Längsinzision erfolgte unter einem Mikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) die Darstellung der Vena jugularis externa und der Arteria carotis communis. Nach Anschlingen der Vena jugularis und proximaler Ligatur

wurde distal über eine Längsinzision des Gefäßes ein Polyethylenkatheter (PE50, Innendurchmesser 0.28 mm, Außendurchmesser 0.61 mm, Smiths Medical International Ltd., Kent, England) intraluminal eingeführt und mit einer vorher vorgelegten Ligatur (Polyester-S grün USP 5/5, nicht resorbierbar, Markneukirchen, Deutschland) fixiert. Ähnlich wurde ein weiterer Katheter in die A. carotis communis eingeführt: nach Freilegung und proximaler Ligatur wurde das Gefäß zunächst mit einem Gefäßclip verschlossen, welcher nach Längsinzision, Einführen und Fixierung des Katheters wieder entfernt wurde. Der in die Arteria carotis communis eingelegte Katheter ermöglichte makrohämodynamische Messungen (mittlerer arterieller Blutdruck, zentralvenöser Druck, Herzfrequenz), sowie Blutentnahmen, der venöse Katheter diente der Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen.

Nach Längslaparotomie wurde bei gleichzeitiger Blutstillung mittels Thermokoagulation eine quere Laparotomie durchgeführt, um den Zugang und die nachfolgende Auslagerung des linken Leberlappens zu erleichtern. Zur Mobilisierung des Leberlappens wurden die Haltebänder der Leber zum Zwerchfell, zum Magen und zum Retroperitoneum vorsichtig durchtrennt. Zum Schutz der Abdominalorgane wurden diese mit einer vorher in isotoner Kochsalzlösung getränkten Kompresse bedeckt.

2.2.2 Vorbereitung der Tiere zur Durchführung der *in vivo* Mikroskopie

Die Tiere wurden anschließend auf dem Operationstisch um etwa 45° nach links geneigt und der linke Leberlappen unter Zuhilfenahme von feuchten Wattestäbchen rotiert, so dass die Unterfläche dieses Leberlappens nach oben zu Liegen kam und horizontal ausgelagert werden konnte. Dabei durfte die Unterseite der Leber nicht berührt werden, da sonst Gewebeschädigungen entstanden wären, die die Ergebnisse beeinflusst hätten. Zur Erleichterung der anschließenden Auswertung der *in vivo* Mikroskopie war es wichtig, die Leberoberfläche möglichst parallel zum Objektiv zu platzieren. Der Lappen wurde auf einem seiner Form anmodelliertem Plastilinbett gelagert, mit 37°C angewärmter physiologischer Kochsalzlösung superfundiert und mit einem runden Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) bedeckt, um die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen. Die restliche Leberoberfläche wurde mit einer Sauerstoff-impermeablen Folie bedeckt, um sie gegen Austrocknung und vor der Exposition gegenüber atmosphärischem Sauerstoff zu schützen. Auch während der Mikroskopie wurde die Leber immer wieder mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet, um diese vor Austrocknung zu schützen.

2.2.3 Experimentelle Gruppen und Prämedikation

Die Vorbehandlung der Tiere erfolgte jeweils sechs Stunden vor der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.

Das Experiment beinhaltete drei Versuchsgruppen mit jeweils sechs Tieren:

- G-L-Gruppe: Zur Induktion eines akuten Leberversagens erhielten die Tiere der ersten Versuchsgruppe sechs Stunden vor intravitalmikroskopischer Untersuchung der Leber eine einmalige intraperitoneale Injektion von D-Galactosamin (D-GalN; 720 mg/kg KG, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und des Lipopolysaccharids von *Escherichia coli* (LPS; 10 µg/kg KG; Serotyp 0128:B12, Sigma-Aldrich) in 2 ml 0,9%iger NaCl verdünnt.
- G-L/ALP-Gruppe: Die Tiere der zweiten Versuchsgruppe wurden zur therapeutischen Modulation des Leberschadens unmittelbar nach intraperitonealer Injektion von D-Galactosamin und LPS mit Antileukoproteinase (ALP; 15 mg/kg KG) behandelt.
- KON-Gruppe: Die dritte Gruppe, d.h. die Kontrollgruppe, diente der Erhebung physiologischer Parameter, wobei diese Tiere sechs Stunden vor Mikroskopie entsprechende Volumina physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert bekamen.

Die Konzentrationen der o.g. Substanzen wurden bereits veröffentlichten Arbeiten entsprechend eingesetzt (Leist et al., 1995; Morikawa et al., 1996; Klintman et al., 2004).

Zur Gewinnung weiterer Blut- und Gewebeproben wurden zusätzliche Tiere in derselben Dosierung wie oben beschrieben mit D-GalN/LPS ohne bzw. mit Injektion von ALP vorbehandelt. Tiere, die entsprechende Volumina physiologischer Kochsalzlösung erhielten, dienten wiederum als Kontrolle. Diesen Versuchstieren wurden nach 4 oder 6 Stunden unter Ketamin/Xylazin-Narkose durch retroorbitale Punktion Blut und anschließend Gewebe entnommen (n = 6 pro Gruppe und Zeitpunkt).

2.3 Rekombinante Antileukoproteinase

Humane ALP wurde in *Escherichia coli* als rekombinantes Protein hergestellt. Anschließend erfolgte die Reinigung bis zur Homogenität durch ein aus mehreren Schritten bestehendes Protokoll mittels Ionenaustausch-, Metallchelat- und Gel-Permeations-Chromatographie, wie erstmals durch Heinzl-Wieland et al. 1991 beschrieben. Analytische Reverse Phase Chromatographie ergab einen einzigen Peak und SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) mit nachfolgender Silberfärbung zeigte ein einziges elektrophoretisches Band auf Höhe der für ALP erwarteten Reinigungsstufe.

Als nächstes wurde untersucht, ob das Material die Aktivität der Granulozytenelastase und Cathepsin G hemmt. Um eventuell noch verbleibendes Endotoxin in der gereinigten Fraktion zu entfernen, durchliefen die ALP-Proben den Herstellerangaben entsprechend Detoxi-Gel-Säulen (Polymyxin B-konjugierte Säulen; Perbio Science, Bonn, Deutschland). Schließlich wurden die endgültigen ALP-Präparate vor ihrem Gebrauch mit Hilfe des *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) gel-clot assay (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) routinemäßig getestet, um für alle analysierten Proben sicherzustellen, dass der Endotoxingehalt unter der Nachweisgrenze von 0,05 U/ml blieb.

2.4 Untersuchungstechniken

2.4.1 Makrohämodynamik

Über den Katheter in der Arteria carotis communis, der an einen Druckwandler (Sirecust 1261, Siemens Medical Electronics, Danvers, USA) angeschlossen war, wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz unmittelbar nach Einsetzen des arteriellen Katheters sowie vor und nach der Mikroskopie ermittelt.

2.4.2 Mikrozirkulation der Leber

Die *in vivo* Mikroskopie ermöglicht es, eine Vielzahl an Parametern der Mikrozirkulation in der Leber zu untersuchen und zu beurteilen, wie zum Beispiel:

- Anzahl der perfundierten Lebersinusoiden
- Aktivität der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Lebersinusoiden
- Aktivität der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Venolen

2.4.2.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie – Grundlagen

Fluoreszenzmarkierungen ermöglichen die Lokalisierung bestimmter Bestandteile komplexer biomolekularer Strukturen, inklusive lebender Zellen. Bestimmte Moleküle, sogenannte Fluorophore, absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren dann Licht einer anderen (längerwelligen) Wellenlänge (entsprechend der Stokes-Regel). Jedes Fluorophor hat ein Absorptionsspektrum (Exzitation) kleinerer Wellenlänge, bei dem es angeregt wird und ein Fluoreszenzspektrum (Emission) größerer Wellenlänge, bei der die Detektion des Fluoreszenzlichts erfolgt. Bestimmte Elektronen der Fluorophore absorbieren die Photonen, gelangen dadurch aus dem Grundzustand (S_0) auf ein höheres Energieniveau (S_1') in den Singulett-Zustand und fallen innerhalb kürzester Zeit, ca. 10^{-12} Sekunden nach Anregung, auf ihren stabilen Grundzustand zurück. Dabei wird die aufgenommene Energie ($h\nu$) in Form von Wärme, chemischer oder elektromagnetischer Energie wieder frei und es kommt zur Emission des Fluoreszenzlichts.

Bei der konventionellen Mikroskopie im Hellfeld ist eine Fluoreszenz im Präparat nicht sichtbar, da Fluoreszenzen sehr lichtschwach sind und überstrahlt werden. Die Intravitalmikroskopie erlaubt durch eine Auswahl bestimmter Filter, das helle Anregungslicht und das schwache Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Mikroskops zu trennen und ermöglicht somit die Visualisierung und quantitative Analyse der Mikrozirkulation:

Lichtquellen von Mikroskopen liefern Licht, das Wellenlängen aus dem gesamten Lichtspektrum enthält. Dieses Licht wird anhand eines dichromatischen Spiegels in seine Spektralfarben zerlegt. Der Anregungsfilter sorgt dafür, dass nur die für die Anregung einer bestimmten Fluoreszenz notwendige Lichtfarbe einer bestimmten Wellenlänge (z.B. blaues Licht) hindurch geht. Dieses nahezu einfarbige Licht erreicht das Präparat und regt die Fluoreszenz an, sodass Licht größerer Wellenlänge (in diesem Fall grünes Licht) emittiert

wird. Der Lichtstrom fließt anschließend durch den Sperrfilter, der nur das durch das Präparat emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht durchlässt, und das noch vorhandene blaue Anregungslicht absorbiert. Schließlich kommt es zur Entstehung des Bildes, wobei Objektdetails in der Farbe des entsprechenden Fluoreszenzlichtes auf dunklem Hintergrund erscheinen.

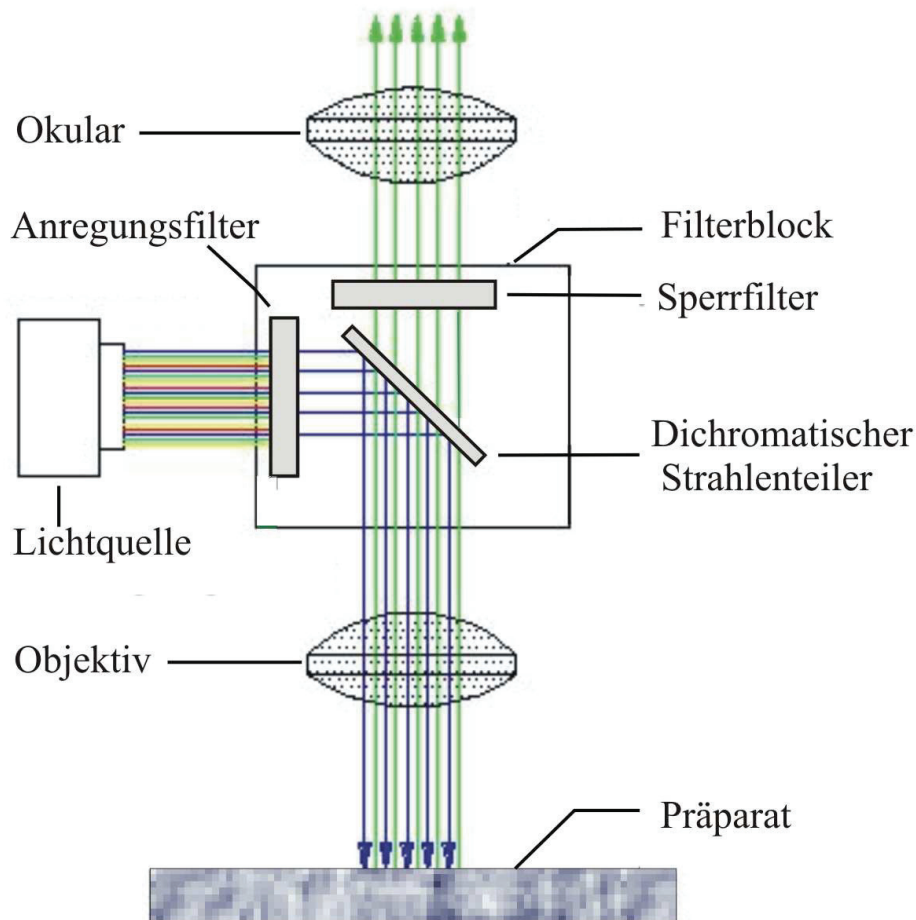


Abb. 4: Schemazeichnung zum Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

(Modifiziert nach: <http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz>)

Die Mikroskopie wurde mittels eines Zeiss Fluoreszenz Mikroskops mit einer 100 Watt Quecksilber Lampe und unterschiedlichen Filtern für blaue, grüne und ultraviolette Epi-Illumination (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden durch verschiedene Wasser-Immersionsojektive (x20/0.50W und x40/0.80; Zeiss) erfasst und mittels einer Charge Coupled Device (CCD) - Videocamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50

Halbbildern pro Sekunde auf ein Videoband (Fuji magnetic GmbH, Kleve, Deutschland) aufgezeichnet. Über einen Videozeitgenerator (Fora Video Timer, model VTG33, Fora company limited, Japan) wurden gleichzeitig das Datum und die Uhrzeit in das Videoband eingeblendet. Die Videobänder konnten somit später off-line evaluiert werden.

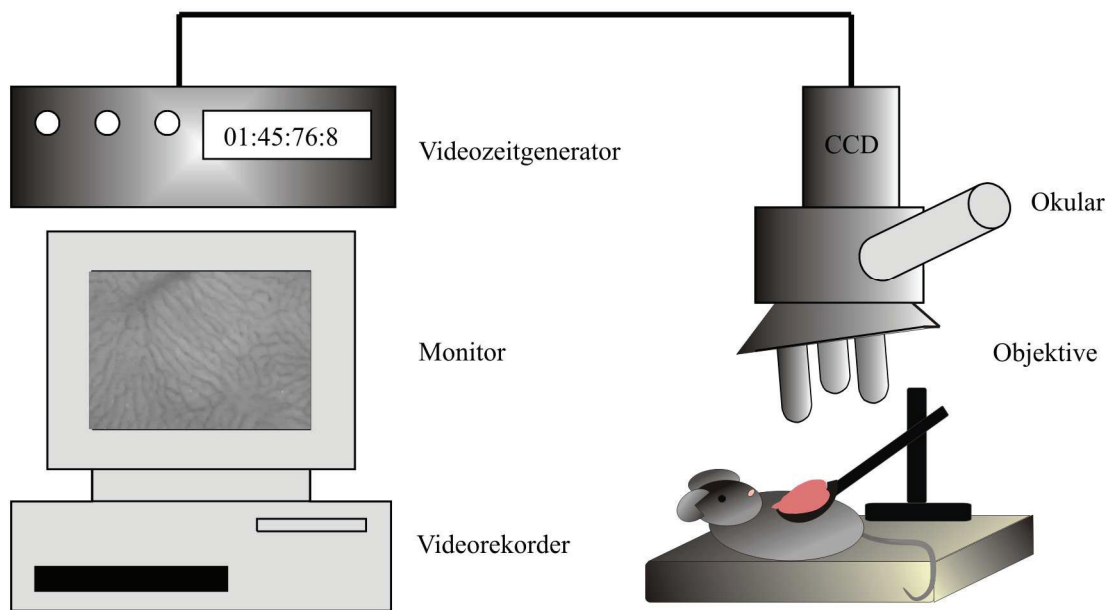


Abb. 5: Schema der Versuchsanordnung

2.4.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Bei der *in vivo* Mikroskopie stehen eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung. Für diese Studie wurden Natriumfluoreszein und Rhodamin 6G zur Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation verwendet.

Natriumfluoreszein ($C_2H_{10}Na_2O_5$; 376 Da; Absorptionsmaximum: 490-492 nm) ist ein niedermolekulares Molekül, das aufgrund der Fenestrierung des Leberendothels schnell in den Extravasalraum diffundiert und daraufhin vor allem in den perizentralen Bereichen der Leber von Hepatozyten aufgenommen wird. Dadurch kommt es bei intravenöser Injektion (2 $\mu\text{mol/kg}$ KG iv.; Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Kontrastverstärkung zwischen den Lebersinusoiden und den Hepatozyten, wobei die Hepatozyten hell und die Gefäße schwarz erscheinen. Bei Beleuchtung mit Blaulicht der Wellenlänge 450-490 nm wird Natriumfluoreszein zur Lichtemission angeregt und emittiert daraufhin Licht mit einer

Wellenlänge >520 nm. Dies ermöglichte die Untersuchung der Blutperfusion innerhalb individueller Sinusoide.

Rhodamin 6G ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$; 479 Da) akkumuliert in Leukozytenmitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotential. Injektion von Rhodamin 6G (1 $\mu\text{mol/kg}$ KG iv.; Merck, Darmstadt, Deutschland) zur *in vivo* Kontrastierung von Leukozyten ermöglicht die quantitative Analyse des Leukozytenfließverhaltens sowohl in Sinusoiden als auch in postsinusoidalen Venolen. Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 530-560 nm resultiert in einer Emissionswellenlänge von >580 nm.

2.4.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Anhand der intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter Verwendung des 20x Wasser-Immersionsobjektives (W 20x/0.5, Zeiss, Jena, Deutschland), das heißt bei 465-facher Vergrößerung, die Beurteilung mikrozirkulatorischer sowie mikrohämodynamischer Parameter innerhalb der Sinusoide und postsinusoidalen Venolen, wie der azinären Perfusion und des Leukozyten-Fließverhaltens.

Nach Beendigung der Videoaufnahmen konnten diese später computergestützt mit Hilfe eines Computer-assistierten Bildanalyse-Systems (Capimage®; Zeintl, Heidelberg, Deutschland) durch Abspielen des Videobandes ausgewertet werden. Die quantitativen Analysen der mikrozirkulatorischen Parameter wurden bei 424-facher Vergrößerung mittels Bild-zu-Bild-Analyse durchgeführt. Dabei wurden für jeden einzelnen Parameter des jeweiligen Versuchstieres 10 Gesichtsfelder ausgewertet.

2.4.3.1 Sinusoidale Perfusion

Nach Kontrastverstärkung durch Injektion von Natriumfluoreszein (2 $\mu\text{mol/kg}$ KG iv.; Merck, Darmstadt, Deutschland) und Epiillumination mit Blaulicht (450-490 nm/>520 nm, Wellenlänge der Anregung/Emission) wurde der Perfusionsausfall innerhalb 10 zufällig ausgewählter Azini pro Tier aufgenommen, um später die Anzahl perfundierter Sinusoide im Verhältnis zu allen Sinusoiden, die eine 200 μm Raster-Linie midzonal im rechten Winkel zum Verlauf der Sinusoide durchquerten, zu bestimmen.

2.4.3.2 Mikrovaskuläre Leukozyten-Akkumulation

Durch Injektion von Rhodamin 6G (1 $\mu\text{mol/kg KG iv.}$) und Beleuchtung mit grünem Licht (530-560 nm/>580 nm) wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion innerhalb von je 10 beliebigen Azini und postsinusoidalen Venolen pro Versuchstier untersucht. Diese beinhaltete:

- die Anzahl stagnierender Leukozyten in den Sinusoiden, welche sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 20 Sekunden nicht bewegten (angegeben in Zellen/ mm^2), sowie
- die Anzahl adhärenter Leukozyten in postsinusoidalen Venolen, die sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 20 Sekunden weder bewegten noch von der Gefäßwand lösten. Die jeweiligen Venolen wurden zunächst unter Benutzung des Blaufilters ausgewählt und erst im nächsten Schritt mit Hilfe der Kontrastierung durch Rhodamin 6G im Grünfilter analysiert, um später am Capimage die Länge l (in μm) und den Durchmesser d (in μm) exakt ausmessen zu können. Bei Annahme zylindrischer Geometrie wurde die Endotheloberfläche aus Durchmesser und Länge des untersuchten Gefäßsegmentes nach der Formel

$$A = d * \pi * l / 10^6 \text{ (mm}^2\text{)}$$

berechnet und die Anzahl adhärenter Leukozyten als Zellen pro mm^2 Endotheloberfläche angegeben (Eipel et al., 2004).

2.4.4 Probeentnahmen und Analyse

Nach Abschluss der *in vivo* Mikroskopie der Leber wurde den Tieren Blut und außerdem Lebergewebe für histologische, immunhistochemische und Western Blot Analysen entnommen.

Wie oben bereits beschrieben, wurde zusätzlichen Versuchstieren, die der gleichen Vorbehandlung unterzogen (Injektion von D-GalN/LPS ohne bzw. mit Injektion von ALP sowie Injektion entsprechender Volumina physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle; $n = 6$ pro Gruppe und Zeitpunkt) und *nicht mikroskopiert* wurden, nach 4 oder 6 Stunden unter Narkose mit Ketamin/Xylazin durch retroorbitale Punktion Blut und anschließend Gewebeprobe entnommen.

2.4.4.1 Blutentnahmen

Am Ende jedes Versuches wurde den Tieren ca. 2 ml Vollblut aus der Vena cava inferior entnommen, in Ca^{2+} -EDTA-beschichtete Röhrchen asserviert und ein Blutbild erstellt. Anschließend wurde das entnommene Blut für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (GS15 Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und der Überstand bis zur Durchführung biochemischer Analysen bei -20°C aufbewahrt.

2.4.4.2 Gewebeproben

Die entnommene Leber wurde gewogen und danach, mit Ausnahme des mikroskopierten Leberlappens, der nicht asserviert wurde, in kleine Stücke geschnitten. Ein Teil der Leber wurde für nachfolgende molekularbiologische Analysen in Flüssigstickstoff eingefroren. Ein weiterer Teil wurde nach Einbetten in TissueTek (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) auch in Flüssigstickstoff eingefroren, in Alufolie eingewickelt und anschließend bei -80°C für die entsprechenden immunhistologischen Nachweise aufbewahrt. Für histologische Untersuchungen wurde noch ein Stück Lebergewebe in 4%igem phosphatgepuffertem Formalin für ca. 2-3 Tage fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Die Tiere wurden nach Abschluss der Versuche durch Injektion einer Ketamin-Überdosis getötet.

2.4.5 Vollblut- und Serumanalytik

2.4.5.1 Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Plasma

Aspartat-Aminotransferase (AST) bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT) bzw. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) sind leberspezifische Enzyme, deren Aktivität im Plasma bei Leberzellschädigung erhöht nachweisbar ist. Daher kann man anhand der Höhe der Aktivität dieser Transferasen eine Aussage über die hepatozelluläre Desintegration machen. AST ist hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert und deutet deswegen bei Erhöhung auf einen stärkeren Leberschaden hin als ein alleiniger Anstieg der zytoplasmatischen ALT.

Die Messung der Aktivitäten von AST und ALT im Serum erfolgte spektrophotometrisch nach Bergmeyer et al. (1978) anhand des Hitachi 704 Automatic Analysers (Boehringer, Mannheim, Deutschland).

2.4.5.2 *Bioplex Protein Array System*

Zur Bestimmung der Plasmakonzentration verschiedener Zytokine diente das Bioplex Protein Array System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Das System ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis von bis zu 100 verschiedenen Proteinen in einer einzigen Kavität einer 96-Loch Mikrotiterplatte nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip in einer Probe von nur 12,5 µl Volumen.

Das Prinzip beruht auf der Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Polystyrenkügelchen (Beads), an die ein spezifischer Antikörper (AK) kovalent gebunden ist. In einer Mikrotiterplatte wurden die jeweiligen Proben bzw. ein bekannter Standard zusammen mit den AK-gekoppelten Beads in die Plattenwells pipettiert und für 30 Sekunden bei 1100 U/min und anschließend für 60 Minuten bei 300 U/min im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Hierbei binden die im Überstand präsenten Zytokine, u.a. TNF- α , IL-5 und IL-10, an den auf der Oberfläche der Polystyrenkügelchen haftenden Antikörper. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen und ein zweiter biotinylierter Detektionsantikörper hinzugegeben, welcher spezifisch an ein anderes Epitop der gesuchten Zytokine bindet. Danach wurde die Platte ein weiteres Mal für 30 Sekunden bei 1100 U/min und anschließend für 60 Minuten bei 300 U/min im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach Entfernung von überschüssigen Detektionsantikörpern durch Vakuumfiltration und drei weiteren Waschschritten wurde PE (Phosphatidylethanolamin)-konjugiertes Streptavidin hinzugegeben. Es folgten ein Inkubationsschritt von 10 Minuten bei 300 U/min auf dem Schüttler im Dunkeln bei Raumtemperatur sowie drei weitere Waschschrritte, um das ungebundene Streptavidin zu entfernen.

Anhand der Bioplex Manager Software wurden die Konzentrationen von TNF- α , IL-5 und IL-10 quantifiziert. Die Messung erfolgt nach dem durchflusszytometrischen Prinzip: Mittels einer Kanüle wird jeweils ein kleines Volumen aus der Probe aufgenommen und zu einer Durchflusszelle geleitet. Hierbei werden die Polystyrolkügelchen an zwei verschiedenen Lasern vorbeigeleitet. Der erste Laser (rotes Licht) klassifiziert die einzelnen Beads und damit

die Proteine. Der zweite Laser (grünes Licht) regt die auf der Oberfläche der Beads gebundenen Fluorochrome an und ermöglicht so die Quantifizierung der gebundene Menge der jeweiligen Zytokine und Wachstumsfaktoren aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität.

2.4.6 Histologie

Die entnommenen Gewebeprobe wurden 2-3 Tage lang in 4%iger phosphatgepufferter Formalinlösung fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von 5 µm dicken Schnitten aus diesen Paraffinblöcken wurden diese auf Objektträgern fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin (H.-E.) angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte an einem Lichtmikroskop untersucht. Anhand der H.-E.-Schnitte konnte das Ausmaß der Gewebsschädigung analysiert werden.

Die TUNEL (*Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*)-Analyse gilt in der Literatur als etablierte Nachweismethode für Apoptose. Die Methode weist die freien 3'-OH Gruppen nach Fragmentierung der DNA nach. Von den in Paraffin eingebetteten Geweblöcken wurden daher weitere 5 µm Schnitte auf poly-L Lysin Glas-träger übertragen und einem Apoptose-spezifischen Färbungs-Kit (indirect in situ nick end labeling (TUNEL) assay; ApopTag, CHEMICON International, Inc., Temecula, CA, USA) nach Angaben des Herstellers ausgesetzt:

Die Glas-träger wurden für 15 Minuten bei 37°C mit einer Proteinase vorbehandelt, um die Enzympermeabilität der Proben für eine gleichmäßige Aufnahme von Nukleotiden zu erhöhen und danach mit destilliertem Wasser je zwei Minuten lang gewaschen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidase erfolgte die Hinzugabe von 2% (v/v) Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung) und eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Proben wurden daraufhin mit PBS gewaschen, für 15 Minuten bei 37°C in Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Markierungspuffer eingetaucht und danach 60 Minuten lang bei 37°C mit TdT und digoxigenin-dUTP (digoxigenin-desoxy-Uridyltriphosphat) inkubiert. Nach Anhalten der Reaktion durch Transfer der Proben in einen ‚Stop‘-Puffer für 30 Minuten bei 37°C wurden die Proben wieder in PBS gewaschen. Das 3'-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrat Kit (Vektor laboratories, Burlingame, CA, USA) diente der Entwicklung der Träger (Thomas et al., 1998). Das Resultat sind dunkelbraune Zellen, die DNA-Fragmentierung zeigen.

TUNEL-positive Nuklei wurden lichtmikroskopisch rasterförmig innerhalb von 30 Gesichtsfeldern ausgezählt (40x Objektiv/0.65 numerische Apertur) und als Anzahl apoptotischer Zellen pro mm² Gesichtsfeld angegeben. Dabei wurden TUNEL-positive Hepatozyten von TUNEL-positiven nicht-parenchymatösen Zellen differenziert.

2.4.7 Immunhistochemie

2.4.7.1 *Nuclear Factor kappa B-phospho 65*

NFκB liegt in seiner inaktiven Form im Zytoplasma an das Inhibitorprotein IκBα gebunden vor. Bei Aktivierung durch verschiedene Stimuli, z.B. durch LPS, kommt es zur Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Degradation von IκBα. Das somit von seinem Inhibitor freigesetzte NFκB wird anschließend durch Phosphorylierung der p65-Untereinheit aktiviert und transloziert in den Nukleus, wo es an bestimmte DNA-Sequenzen bindet. IκBα wird schnell wieder resynthetisiert, um erneut die inhibitorische Kontrolle von NFκB aufzunehmen.

Zum Nachweis der Konzentration von NFκB-p65 wurden Lebergewebeproben auf einem poly-L Lysin Glasträger fixiert und zunächst einem gegen die menschliche NFκB-p65 Untereinheit gerichteten Primärantikörper (mouse monoclonal anti-human NFκB-p65 subunit antibody; 1:3000; Chemicon Int., Temecula, CA, USA), dann einem Sekundärantikörper (sheep anti-mouse Ig antibody; 1:5000; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) ausgesetzt. NFκB-p65 positive Zellen wurden rasterförmig innerhalb 30 Gesichtsfelder ausgezählt und als NFκB-p65 positive hepatozelluläre Nuklei pro mm² Gesichtsfeld angegeben.

2.4.7.2 *Cleaved Caspase-3 (Western Blot)*

Für die Analyse von Cleaved Caspase-3 mittels Western Blot wurde Lebergewebe in Lysepuffer homogenisiert (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,5% Triton X 100; 0,02% NaN₃; 0,2 mM Polymethan Sulfonylfluorid PMSF), für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 15 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als

Gesamtprotein-Fraktion abpipettiert und aufbewahrt. Vor Benutzung des Puffers wurde diesem ein Proteaseinhibitor-Cocktail (1:100 v/v; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hinzugefügt. Mit Hilfe des ‚Bicinchoninic Säure‘ (bicinchoninic acid BCA) Protein Assays mit Rinder Serumalbumin als Standard wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt.

Auf einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gel (12%) wurden 40 µg Protein/Spur elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Polyvinylidfluorid Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) übertragen. Nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen für 120 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (rabbit anti-cleaved caspase-3; Asp 175; 1:1000; Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland) und anschließend für 90 Minuten mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (peroxidase-conjugated goat anti-rabbit; 1:2000, Cell Signalling Technology) inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels der Chemilumineszenzmethode (ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und durch Autoradiographie auf einem Blaulicht empfindlichen Röntgenfilm (Kodak BioMax Light Film, Kodak-Industrie, Chalon-sur-Saone, Frankreich) sichtbar gemacht. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet (Gel-Dokumentations-System TotalLab, Nonlinear Dynamics, New Castle upon Tyne, UK) und an den β -Aktin Signalen normiert (monoklonale Maus anti- β -Aktin Antikörper, 1:20.000; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland).

2.4.8 Überlebensversuche

Um eine Aussage über das Überleben zu erhalten, wurden weitere Versuche wie folgt durchgeführt:

In zwanzig Tieren wurde durch intraperitoneale Injektion von D-GalN/LPS (D-GalN 720 mg/kg KG ip und LPS 10 µg/kg KG ip) ein akutes Leberversagen induziert. Zehn dieser Tiere wurden zusätzlich mit ALP (15 mg/kg KG ip), die anderen zehn mit physiologischer Kochsalzlösung (100 µl ip) vorbehandelt.

In einer zweiten Überlebensstudie kam eine dritte Gruppe hinzu, bei der die Versuchstiere neben der Applikation von ALP etwa 10 Minuten nach Induktion des akuten Leberversagens zusätzlich rekombinantes Maus Interleukin-10 (IL-10 1 µg pro Maus) erhielten:

- 10 Tiere: Injektion von D-GalN / LPS + NaCl
- 10 Tiere: Injektion von D-GalN / LPS + ALP + NaCl
- 10 Tiere: Injektion von D-GalN / LPS + ALP + IL-10

Die Dosierung des IL-10-Fc Fusionsproteins (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurde entsprechend vorheriger Arbeiten durchgeführt (Emmanuilidis et al., 2001; Manley et al., 2005). Innerhalb der ersten 12 Stunden wurden die Versuchstiere stündlich untersucht und eventuell verstorbene Tiere entfernt.

Mäuse, die innerhalb von fünf Tagen nicht verstarben, wurden als überlebende Tiere eingestuft.

IL-10

Interleukin-10 wurde als Zytokin mit antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften beschrieben. Es wird durch T-Zellen und Makrophagen produziert. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass endogen produziertes und exogen appliziertes IL-10 primär in Modellen des endotoxämischen und bakteriämischen Schocks das Ausmaß der inflammatorischen Antwort reduziert (Oberholzer et al., 2002). Aus diesem Grund wurde die zweite Überlebensstudie durchgeführt.

2.5 Zusammenfassung des experimentellen Protokolls

Wie unter 2.2.3 beschrieben, beinhaltete das Experiment drei Gruppen intravitalmikroskopierter Tiere, welche jeweils 6 Stunden vor der Mikroskopie entsprechend vorbehandelt wurden (n = 6 pro Gruppe):

1. **G-L** (10 µg/kg KG LPS ip; 720 mg/kg KG D-GalN ip)
2. **G-L/ALP** (s.o. + 15 mg/kg KG ALP ip)
3. **KON** (NaCl ip)

→				
Vorbereitung - G-L - G-L/ALP - KON	Ruhepause (5h)	Präparation (1h)	Mikroskopie	Entnahme von Blut- und Gewebeprobe

Anhand der Intravitalmikroskopie wurden folgende Parameter untersucht, wobei pro Parameter 10 Gesichtsfelder analysiert wurden:

Im Objektiv x20:

- a. Sinusoidale Perfusion
- b. Leukozyten-Endothelzell Interaktion in Sinusoiden
- c. Größenbestimmung der Venolen
- d. Leukozyten-Endothelzell Interaktion in Venolen

Weitere Tiere, die nicht intravitalmikroskopisch untersucht wurden, dienten der Gewinnung zusätzlicher Blut- und Gewebeprobe 4 beziehungsweise 6 Stunden nach Vorbehandlung (n = 6 pro Gruppe).

→		
Vorbereitung - G-L - G-L/ALP - KON	Ruhepause (4h bzw. 6h)	Entnahme von Blut- und Gewebeprobe

Es wurden außerdem zwei Überlebensstudien durchgeführt:

- 1) 2 Gruppen mit jeweils 10 Versuchstieren:
G-L vs. G-L/ALP

- 2) 3 Gruppen mit jeweils 10 Versuchstieren:
G-L vs. G-L/ALP vs. G-L/ALP/IL-10 Fc

Die Gesamtzahl aller in diesem Versuchsvorhaben verwendeten Tiere lag folglich bei 104 C57BL/6J-Mäusen.

2.6 Statistik

Die bei der Auswertung der Videobänder, der histologischen Schnitte sowie der immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen ermittelten Daten wurden zur elektronischen Datenverarbeitung direkt in Microsoft Excel Tabellen eingegeben.

Mittels der Software SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) wurden anhand dieser Daten Säulendiagramme erstellt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Die statistischen Analysen wurden durch Anwendung des Software Pakets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) ausgeführt.

Nach Testung der Normalverteilung der Werte wurden für den Gruppenvergleich die einfaktorielle ANOVA-Analyse mit nachfolgendem Paarvergleich nach Holm-Sidak durchgeführt.

Ein Unterschied galt dann als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% ($p < 0,05$) betrug.

3. ERGEBNISSE

3.1 Intravitalmikroskopie

3.1.1 Sinusoidale Perfusion und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Durch Injektion von Natriumfluoreszein wird das Parenchym kontrastiert, so dass sämtliche Gefäße der hepatischen Mikrozirkulation dunkel erscheinen, das heißt, das mikrovaskuläre Netzwerk der Leberoberfläche wird im sog. „Negativ“-Kontrast sichtbar.

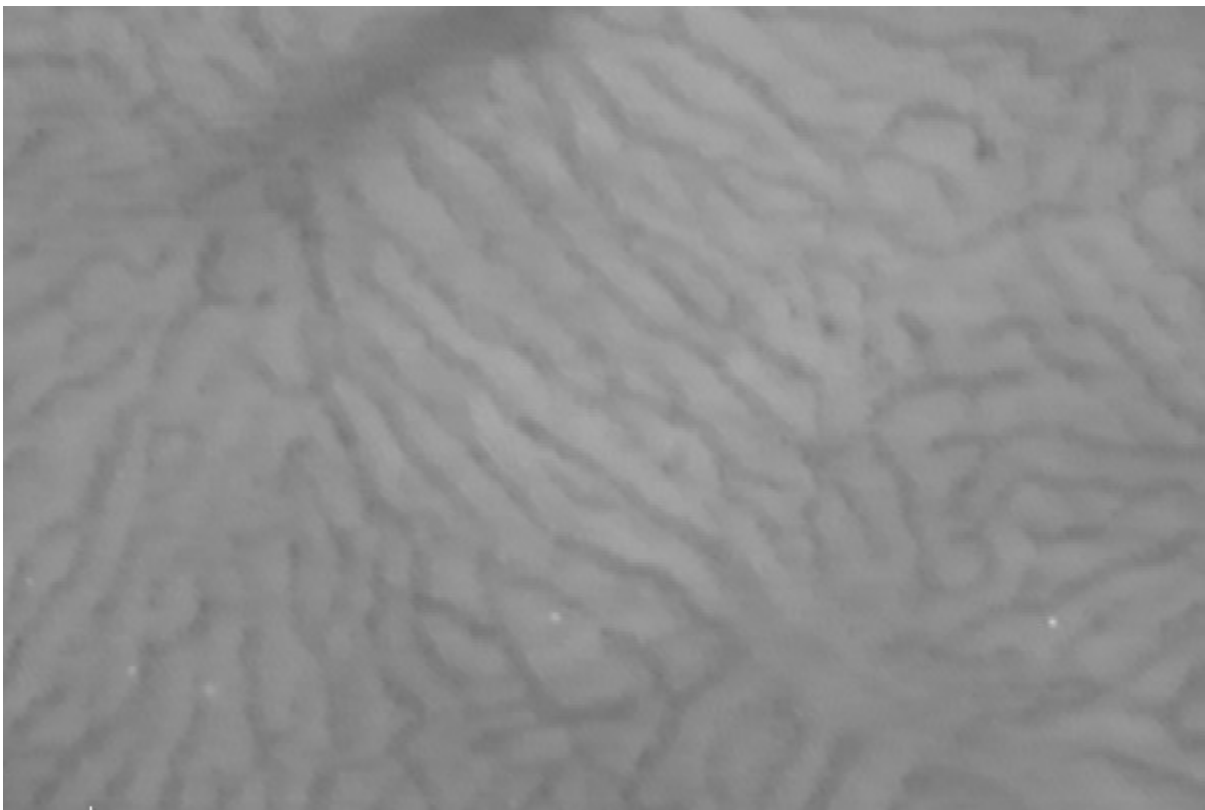
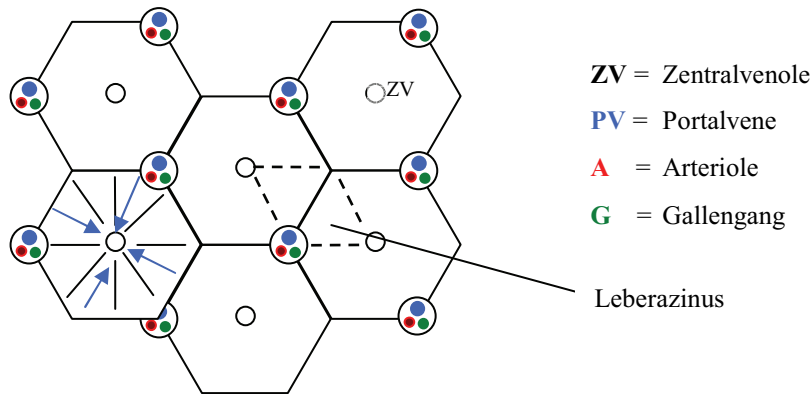


Abb. 6: Intravitalmikroskopisches Bild der Mikrozirkulation der Leber in 465-facher Vergrößerung nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Natriumfluoreszein.

Durch Vergrößerung mit Hilfe des x20-Objektivs werden die hexagonalen mikrozirkulatorischen Einheiten der Leber, sog. Leberläppchen sichtbar.

Im Zentrum eines Leberazinus befinden sich die Äste der zuführenden Portalvenole, begleitet von einer Arteriole sowie einem drainierenden Gallengang, und in dessen Peripherie drainierende postsinusoidale Venolen. Die einzelnen Sinusoide verlaufen sternförmig von der periportal Zone über die midzonale Zone zur perizentralen Zone und münden in die postsinusoidale Venole.



Die Analyse der sinusoidalen Perfusion nach Injektion von Natriumfluoreszein zeigte in Kontrolltieren eine Durchblutung nahezu aller Gefäße, während in den mit D-GalN/LPS vorbehandelten Tieren deutliche Ausfälle von etwa 25% zu beobachten waren. Die Applikation von ALP wirkte sich kaum auf die nutritive Perfusion aus und zeigte nur eine leichte Verbesserung (**Abb. 7A**).

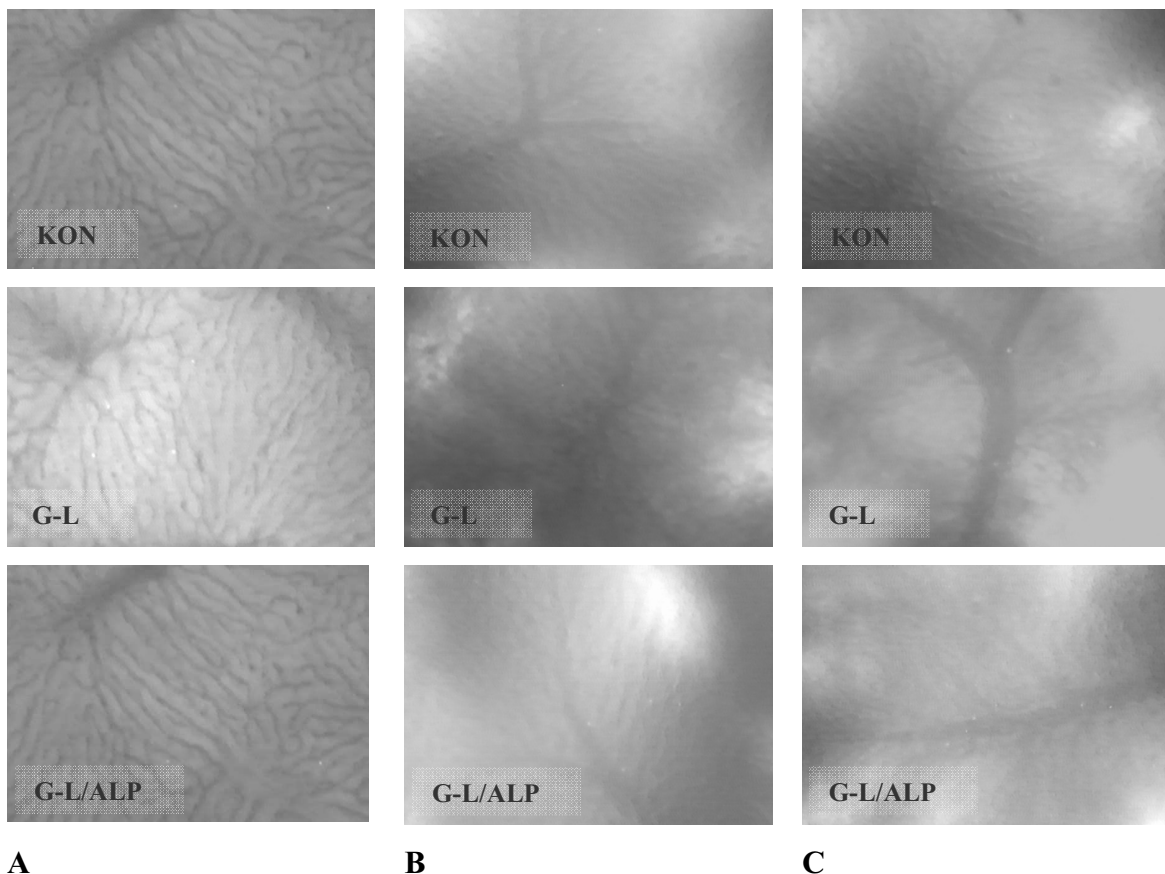


Abb. 7: Repräsentative intravitalmikroskopische Bilder des Lebergewebes von Kontrolltieren, Tieren der G-L-Gruppe sowie der G-L/ALP-Gruppe nach Kontrastverstärkung durch Natriumfluoreszein (**A**) sowie nach Anfärbung von Leukozyten durch Injektion von Rhodamin 6G in Sinusoiden (**B**) und in Venolen (**C**).

Die hepatische Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Sinusoiden sowie in Venolen konnte nach i.v.-Injektion von Rhodamin 6G beurteilt werden. Dabei wurde die Anzahl stagnierender

Leukozyten untersucht, welche sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 20 Sekunden nicht bewegten.

Die Applikation von D-GalN/LPS führte zu einer deutlichen Aktivierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, was die durch die Endotoxinämie verursachte Inflammationsantwort deutlich widerspiegelt. Es kam zu einem starken Anstieg der Leukozytenstase in Sinusoiden. Ebenso war auch in Venolen die Anzahl der am Gefäßendothel fest adhärenen Leukozyten massiv um das ca. 7-fache gegenüber Kontrolltieren erhöht (**Abb. 7B&C**).

ALP konnte die intrahepatische Leukozytenakkumulation sowohl in Sinusoiden als auch in Venolen wesentlich verringern. Im Vergleich zur G-L-Gruppe war die Anzahl der adhärenen Leukozyten in Venolen nahezu um die Hälfte reduziert (**Abb. 7B&C**).

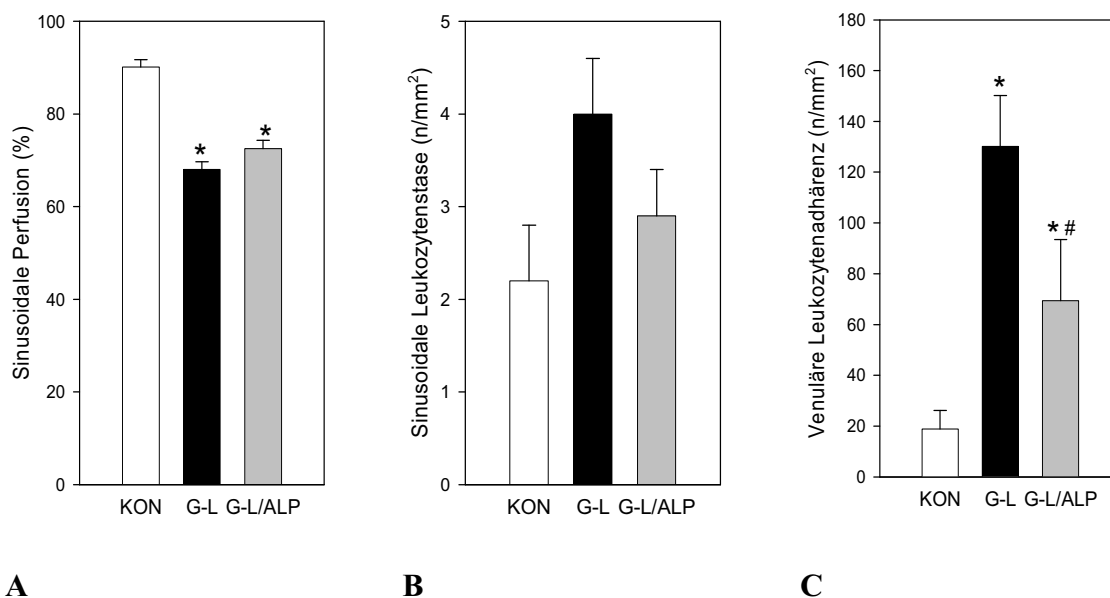


Abb. 8: Quantitative Analyse des sinusoidalen Perfusionsversagens (**A**), der sinusoidalen Leukozytenstase (**B**) und der venulären Leukozytenadhärenz (**C**) in Tieren mit akutem Leberschaden (G-L), in Tieren mit zusätzlicher Injektion von ALP (G-L/ALP) sowie in der Kontrollgruppe (KON). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ vs. G-L.

3.2 Histopathologie

Die mit Hämatoxylin-Eosin (H.-E.) angefärbten Schnitte wurden an einem Lichtmikroskop untersucht (**Abb. 9**).

Die histologischen Schnitte zeigten, dass in D-GalN/LPS-vorbehandelten Tieren pathologische Veränderungen der Hepatozyten vorhanden waren, wie Vakuolisierung, intrazelluläre Ödeme, pyknotische Zellkerne und Schrumpfung des Zytoplasmas (**Abb. 9B**).

Im Vergleich dazu war in Tieren, die ALP erhielten, der histomorphologische Schaden nicht so stark ausgeprägt (**Abb. 9C**). Allerdings gab es zwischen den Tieren innerhalb einer Gruppe individuelle Unterschiede im Schweregrad der Schädigung.

In nicht-septischen Kontrollen hingegen waren strukturelle Schädigungen des Parenchyms nicht nachweisbar. Hier war das Parenchym intakt und weder Nekrosen noch ausgedehnte zelluläre Infiltrationen zu beobachten (**Abb. 9A**).

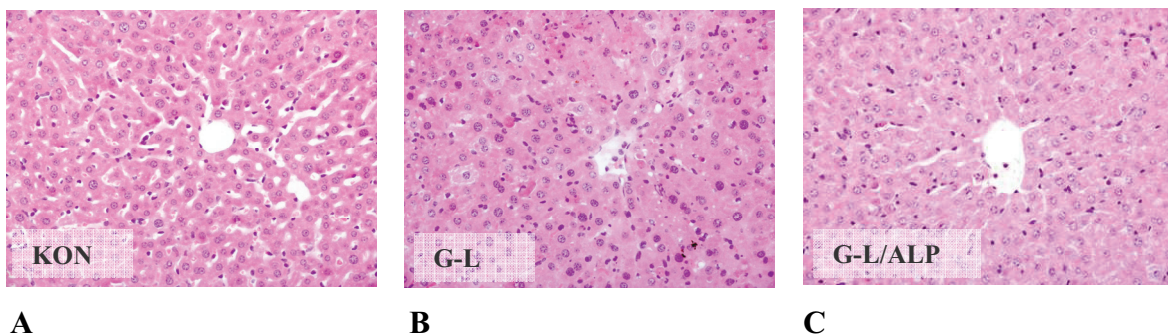


Abb. 9: Repräsentative histologische Bilder des Lebergewebes nach Anfärbung mit H.-E. in 40-facher Vergrößerung. (A) Lebergewebe eines Kontrolltieres; (B) Lebergewebe 6h nach Induktion eines akuten Leberschadens (G-L); (C) Lebergewebe nach Induktion eines akuten Leberschadens und Applikation von ALP (G-L/ALP).

3.3 Hepatozelluläre Apoptose

Zur Quantifizierung des apoptotischen Gewebes Schadens wurden lichtmikroskopisch innerhalb von jeweils 30 Gesichtsfeldern TUNEL-positive Zellen ausgezählt, wobei TUNEL-positive Hepatozyten von TUNEL-positiven nicht-parenchymatösen Zellen unterschieden wurden.

Wie erwartet, waren in Kontrolltieren kaum apoptotische Zellen vorhanden. D-GalN/LPS-Exposition bewirkte eine starke Induktion des apoptotischen Zelltodes, was durch einen beträchtlichen Anstieg der Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten (**Abb. 10A**) sowie nicht parenchymatöser Zellen (**Abb. 10B**) deutlich wurde. Die Gabe von ALP bewirkte nur eine geringe Reduktion der Anzahl TUNEL-positiver Zellen.

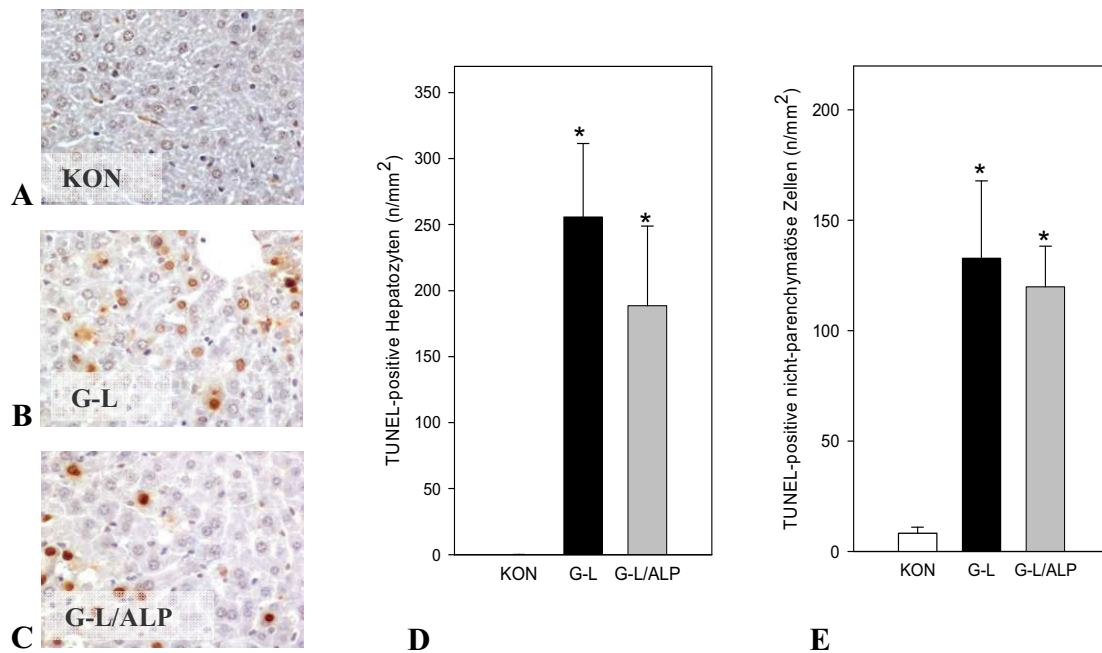


Abb. 10: Repräsentative Bilder eines Kontroll- (**A**), eines D-GalN/LPS- (**B**) und eines D-GalN/LPS/ALP-vorbehandelten Tieres (**C**) sowie quantitative Auswertung der TUNEL-Analysen, angegeben als TUNEL-positive Zellen pro mm² bei gleichzeitiger Differenzierung zwischen parenchymatösen (**D**) und nicht-parenchymatösen Zellen (**E**).

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. KON.

Um die histologischen Ergebnisse der Apoptose mittels TUNEL-Analyse zu verifizieren, wurde zusätzlich durch Western Blot-Analyse die Expression der Cleaved Caspase-3 untersucht.

Entsprechend der Ergebnisse der TUNEL-Analyse reflektierte auch hier eine im Vergleich zu Kontrolltieren massiv erhöhte Induktion der Apoptose mit ca. 6-fach erhöhter Expression der Cleaved Caspase-3 in D-GalN/LPS exponiertem Lebergewebe. Die Applikation von ALP erbrachte wiederum keine wesentliche Reduktion des apoptotischen Zelltodes (**Abb. 11**).

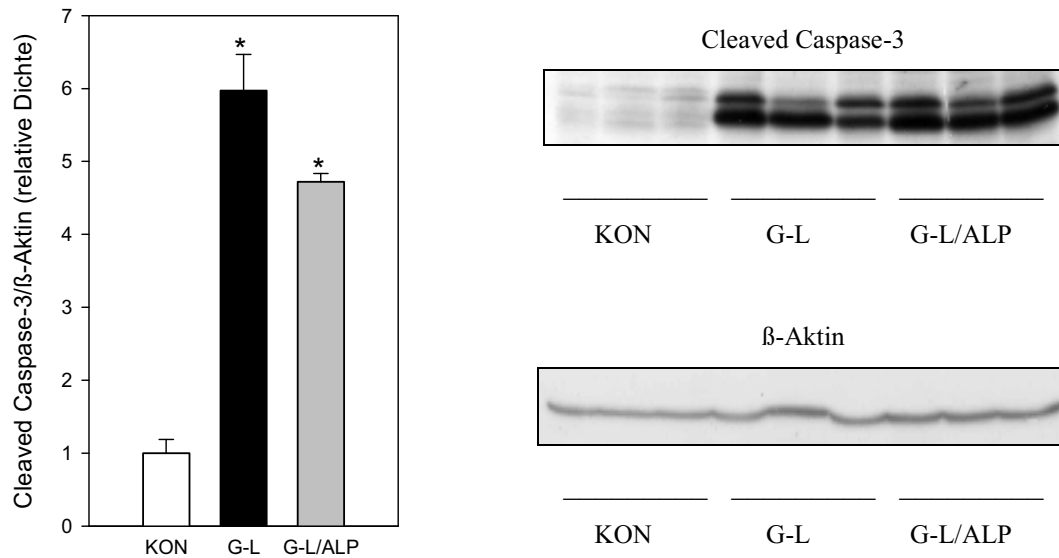


Abb. 11: Repräsentative Western Blot-Analyse sowie densitometrische Analyse der Proteinexpression von Cleaved Caspase-3 nach Normalisierung auf die entsprechenden β -Aktin-Signale in Tieren mit akutem Leberschaden (G-L), in Tieren mit zusätzlicher Injektion von ALP (G-L/ALP) sowie in der Kontrollgruppe (KON).

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. KON.

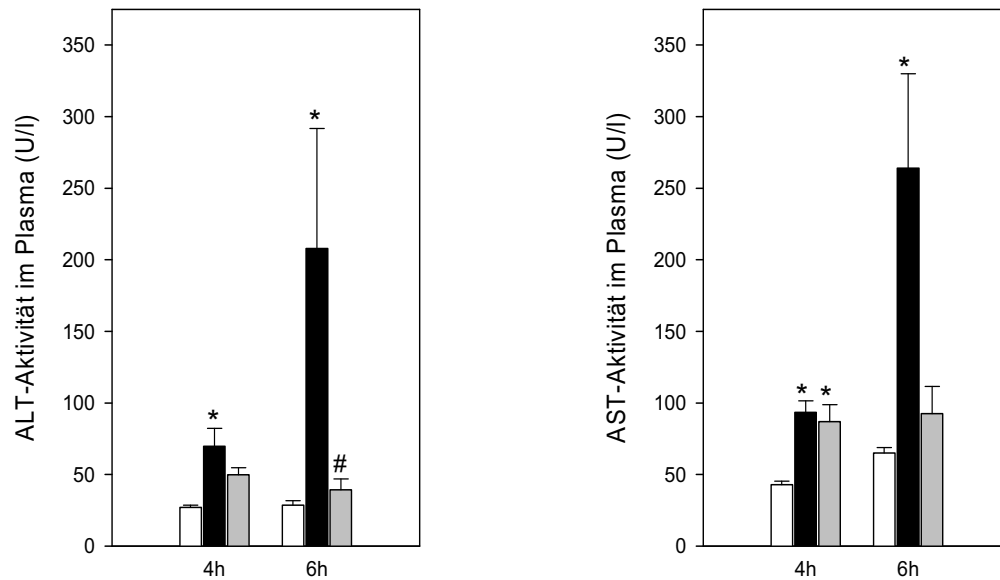
3.4 Hepatozelluläre Integrität

Zur Untersuchung der hepatozellulären Integrität wurden die Aktivitäten der Transaminasen (AST und ALT) 4 und 6 Stunden nach Vorbehandlung spektrophotometrisch im Plasma bestimmt. Aktivitätserhöhungen von ALT und AST im Plasma sind ein wichtiger Befund zur Beurteilung von Lebergewebsschädigungen.

Bereits *4 Stunden* nach Endotoxinämie waren die Enzymaktivitäten sowohl von ALT als auch von AST mehr als doppelt so hoch wie diejenigen in Kontrolltieren (**Abb. 12**).

6 Stunden nach Applikation von D-GalN/LPS waren die Plasmakonzentrationen dieser Leberenzyme in G-L-Tieren massiv erhöht, was einer erheblichen Schädigung des Leberparenchyms entspricht. Vorbehandlung mit ALP konnte die Zellschädigung zunächst (nach 4 Stunden) nicht wesentlich verringern. Bemerkenswerterweise waren 6 Stunden nach Injektion von ALP die Plasma-Aktivitäten der Enzyme so stark verringert, dass diese fast

Kontrollwerte erreichten. Diese Tatsache zeigt, dass Applikation von ALP zu einer beträchtlichen Verringerung des nekrotischen Leberschadens führt (**Abb. 12**).



A

B

Abb. 12: Aktivitäten von ALT (A) und AST (B) im Plasma 4 und 6 Stunden nach Induktion eines akuten Leberschadens ohne (G-L, schwarz) und mit Injektion von ALP (G-L/ALP, grau) sowie in der Kontrollgruppe (KON, weiß).

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ vs. G-L.

3.5 Immunhistochemie

3.5.1 NFkappaB-p65

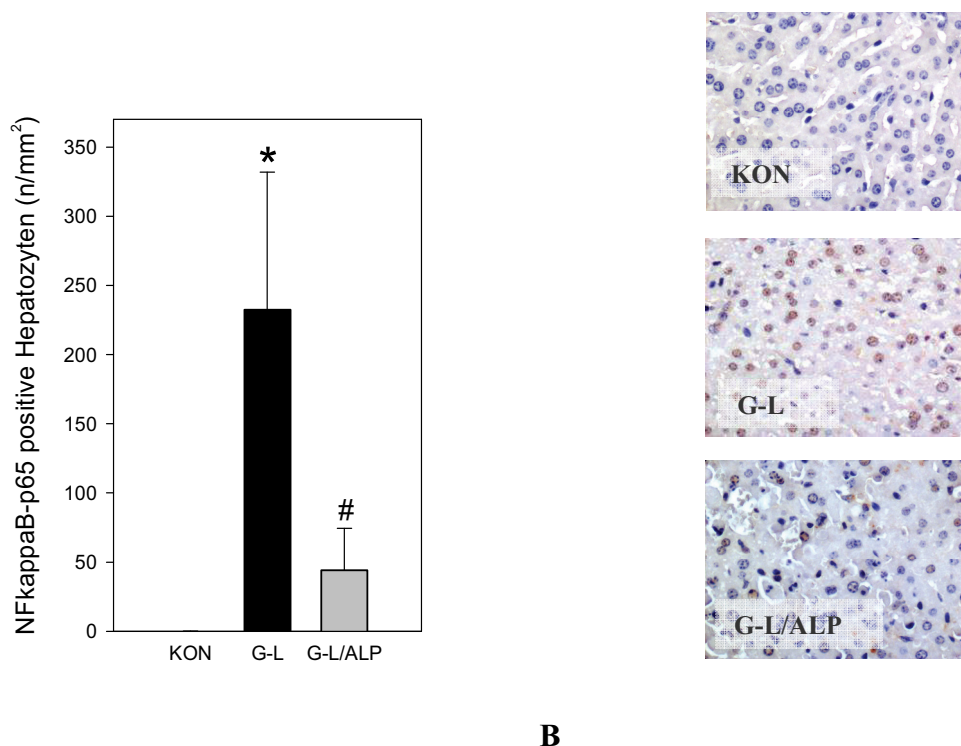
Wie im Abschnitt 2.4.7.1 bereits beschrieben, liegt der Transkriptionsfaktor NF κ B in seiner inaktiven Form an I κ B α gebunden im Zytoplasma vor. Bei Anwesenheit verschiedener Stimuli, wie beispielsweise LPS, wird NF κ B von seinem Inhibitorprotein freigegeben und durch Phosphorylierung der p65-Untereinheit in den aktivierten Zustand überführt, so dass es anschließend in den Zellkern überführt wird, wo es an bestimmte DNA-Sequenzen bindet und zur Transkription sowie Translation einer Vielzahl pro- und antiinflammatorischer

Mediatoren führt. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wird schnell neu gebildet, bindet im Nukleus an $\text{NF}\kappa\text{B}$ und sorgt somit für die Inaktivierung und den Rücktransport dieses Faktors ins Zytoplasma.

Zur Analyse von $\text{NF}\kappa\text{B}$ -p65 positiven Zellen wurden diese lichtmikroskopisch innerhalb von 30 Gesichtsfeldern ausgezählt und in positive hepatozelluläre Nuklei pro mm^2 angegeben.

Die immunhistochemische Analyse von $\text{NF}\kappa\text{B}$ -p65 zeigte, dass die Induktion eines akuten Leberschadens durch D-GalN/LPS-Injektion zu einer massiven Erhöhung der Anzahl positiver Zellkerne im Vergleich zu nicht-septischen Kontrolltieren führte. Dabei dominierte die Anfärbung hepatozellulärer Nuklei.

Im Gegensatz dazu zeigte Lebergewebe von Tieren, die mit ALP vorbehandelt wurden, dass die Anzahl $\text{NF}\kappa\text{B}$ -p65 positiver Zellen nicht nur deutlich reduziert, sondern auch vornehmlich auf das zytosolische Kompartiment der Hepatozyten beschränkt war (**Abb. 13A**).



A **B**
Abb. 13: Quantitative Analyse der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Immunhistochemie, angegeben als Anzahl $\text{NF}\kappa\text{B}$ -p65-positiver Hepatozyten/ mm^2 (A) sowie repräsentative immunhistochemische Bilder eines Kontroll-, eines D-GalN/LPS- und eines D-GalN/LPS/ALP-vorbehandelten Tieres (B).

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) Angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ vs. G-L.

3.6 Plasmaanalyse

Mittels des Bioplex Protein Array Systems wurden die Konzentrationen der Zytokine TNF- α , IL-10 und IL-5 ermittelt.

Wie oben gezeigt führte die Induktion eines akuten Leberschadens zu einer ausgeprägten Zunahme der Anzahl NF κ B-p65-positiver Nuklei, welche durch Injektion von ALP signifikant herabgesetzt wurde. Dementsprechend ergab die Plasmaanalyse der NF κ B-abhängigen Mediatoren TNF- α und IL-10, dass ihre Konzentrationen bei Endotoxinämie merklich erhöht waren und durch die Vorbehandlung mit ALP so stark supprimiert werden konnten, dass sie fast Kontrollniveau erreichten (**Abb. 14A, B**).

Im Gegensatz dazu ergab die Analyse des Plasmazytokins IL-5 in Tieren der Kontrollgruppe verglichen mit der G-L-Gruppe keine merklichen Konzentrationsunterschiede, während diese in ALP-vorbehandelten Mäusen leicht, aber nicht signifikant erhöht waren (**Abb. 14C**).

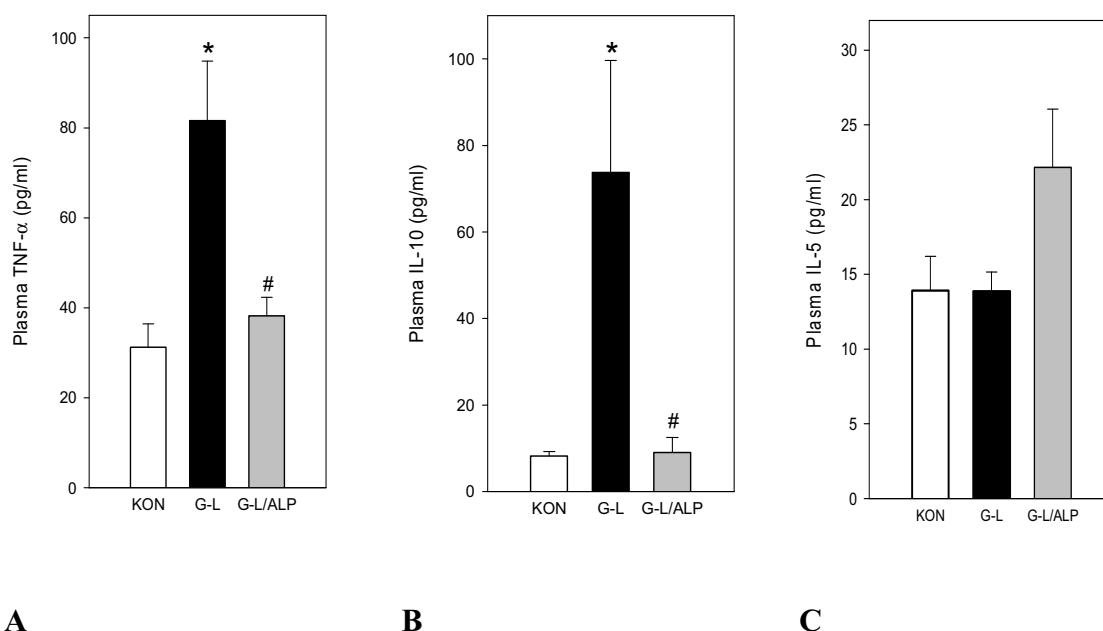


Abb. 14: Plasmakonzentrationen von TNF- α (A), IL-10 (B) und IL-5 (C) in Tieren der Kontrollgruppe (KON), der G-L-Gruppe und der G-L/ALP-Gruppe.

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ vs. G-L.

3.7 Überlebensversuche

Um die Letalität beurteilen zu können, wurden Überlebensversuche durchgeführt. Hierzu wurde in insgesamt 20 Tieren durch Injektion von D-GalN/LPS ein akuter Leberschaden induziert. Von diesen Tieren erhielten 10 eine zusätzliche Applikation von ALP, die restlichen 10 Tiere erhielten physiologische Kochsalzlösung. Die hohe Letalität von 80% konnte durch Behandlung mit ALP nicht merklich reduziert werden (**Abb. 15**).

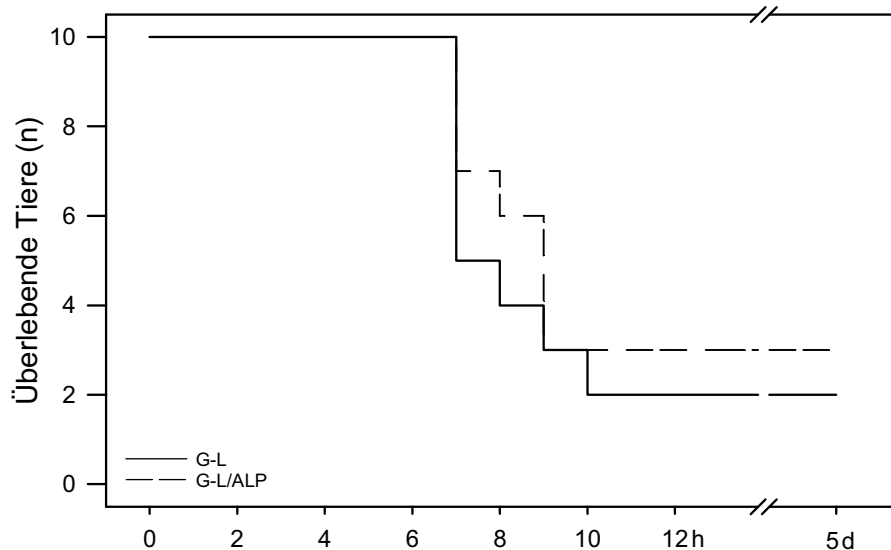


Abb. 15: Überlebenskurve von Tieren nach G-L- bzw. G-L/ALP-Behandlung.

Da, wie weiter oben bereits berichtet, die Applikation von ALP zu einer Reduktion der IL-10-Plasmakonzentration führte, wurde in einer weiteren Überlebensstudie untersucht, ob diese Herunterregulation von IL-10 eine Ursache der unverändert hohen Sterblichkeit der mit ALP vorbehandelten Tiere ist.

Bei dreißig Tieren wurde ein akutes Leberversagen induziert. Zeitgleich erhielten 10 von dreißig Tieren zusätzlich physiologische Kochsalzlösung, weitere 10 erhielten ALP. Den übrigen 10 Tieren wurden ALP sowie etwa 10 Minuten nach der Induktion des akuten Leberschadens rekombinantes Maus Interleukin-10 injiziert.

Von den Tieren, die nur mit D-GalN/LPS vorbehandelt wurden, starben in den nachfolgenden 7 bis 10 Stunden 8 von 10 Mäusen. Zusätzliche Applikation von ALP verbesserte, wie bereits oben gezeigt, die Überlebensrate der Tiere nicht. Gemeinsame Injektion von ALP und IL-10

bewirkte tendenziell eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit, führte jedoch nicht zu einer entscheidenden Reduktion der Letalität (**Abb. 16**).

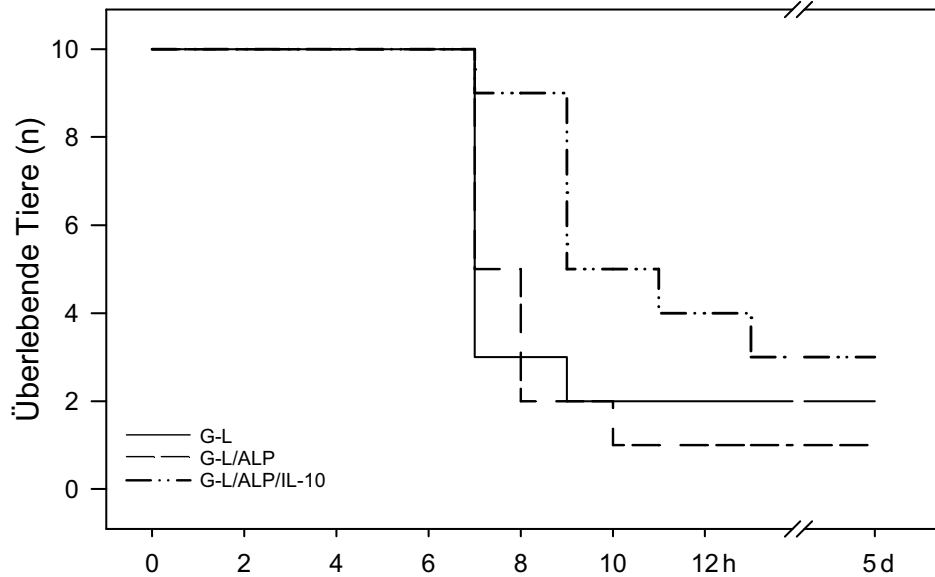


Abb. 16: Überlebenskurve von Tieren nach G-L- und G-L/ALP-Behandlung sowie nach G-L/ALP-Behandlung mit zusätzlicher Applikation von IL-10.

Daher scheint IL-10 in diesem komplexen Geschehen zwar eine entscheidende, jedoch nicht die alleinige Rolle zu spielen.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Anhand der vorliegenden experimentellen *in vivo*-Studie wurde untersucht, ob die Applikation von ALP bei akutem Leberversagen die hepatischen Mikrozirkulationsstörungen und Parenchymveränderungen reduzieren kann und somit therapeutisch wirksam ist. Zusammenfassend wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- die Vorbehandlung mit dem Proteaseinhibitor ALP führt zu einer leichten Verminderung der durch D-GalN/LPS verursachten nutritiven Perfusionsstörung
- die Applikation von ALP bewirkt eine Reduktion der hepatischen Leukozytenstase sowohl in Sinusoiden als auch in Venolen, was eine verminderte inflammatorische Antwort auf den septischen Stimulus in der Leber widerspiegelt
- damit einhergehend führte die Gabe von ALP zu einer signifikanten Reduktion der Plasmaaktivitäten von ALT und AST als Zeichen des eingeschränkten nekrotischen Leberschadens, ohne jedoch die 10-Tage-Sterblichkeit der Tiere zu senken
- die massive hepatozelluläre Apoptose konnte durch Gabe von ALP nur unwesentlich beeinflusst werden
- durch die Gabe von ALP wurde die Anzahl NFkB-p65-positiver hepatozellulärer Kerne, welche durch D-GalN/LPS-Exposition massiv erhöht war, signifikant reduziert
- damit einhergehend waren die Plasmakonzentrationen sowohl von TNF- α als auch IL-10 nach ALP-Gabe signifikant erniedrigt
- die exogene Applikation von IL-10 führte zwar tendenziell zu einer Verlängerung der mittleren Überlebenszeit, konnte die Letalität aber nicht signifikant reduzieren.

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Diskussion des Modells

Die vorliegende Studie diente der Untersuchung einer möglichen therapeutischen Wirkung von Antileukoproteinase während einer Endotoxinämie. Dabei wurden insbesondere die mikrohämodynamischen, zellulären und molekularen Auswirkungen von ALP auf die Leber analysiert.

4.1.1.1 Tiermodelle zur Pathogenese der Sepsis

Standardisierte Tierversuche sind unverzichtbar zur Untersuchung verschiedener Aspekte einer Erkrankung sowie zur präklinischen Erprobung neuer Therapieansätze und somit ein wichtiges Bindeglied zwischen molekular- und zellbiologischen Untersuchungen einerseits und klinischen Studien andererseits (Menger et al., 1999; Wu, 2006).

Trotz viel versprechender neuer, präklinisch erfolgreich eingesetzter Therapieansätze zeigten viele dieser Substanzen in kontrollierten, randomisierten klinischen Studien keine effektive Wirksamkeit. Die Schwierigkeit, ein geeignetes tierexperimentelles Sepsismodell zu entwickeln, welches die klinischen Parameter und Symptome eines Sepsis-Patienten adäquat widerspiegelt, liegt darin, dass das zu stimulierende klinische Bild sehr komplex und mannigfaltig ist (Deitch, 1998; Koike, 2004; Remick & Ward, 2005).

Es gibt im Hinblick auf die humane Sepsis verschiedene Tiermodelle. Häufig angewendete experimentelle Tiermodelle der Sepsis sind die intravenöse Applikation von lebenden Organismen oder Endotoxinen (wie z.B. LPS), die Zökalligation und Punktion (CLP: „cecal ligation and puncture“) oder das Einnähen eines Stents in das Colon ascendens (CASP: „Colon ascendens stent peritonitis“) (Rittirsch et al., 2007). Diese Modelle ahmen die Pathophysiologie der humanen Sepsis nach.

Beim CLP-Modell wird das Zökum unterhalb der Ileozökalklappe ligiert und mit einer Nadel punktiert. Aus dem so künstlich erschaffenen Leck wird anschließend etwas Darminhalt herausgedrückt, so dass sich eine polymikrobielle Peritonitis entwickelt (Zhang et al., 2007).

Mit zunehmender Größe der Nadel und somit der Perforation in der Darmwand steigt die Letalität (Benjamin et al., 2002).

Bei der CASP wird mit dem Einbau eines Stents in das Colon ascendens von Mäusen eine Verbindung vom Darmlumen in das Peritoneum geschaffen, was einen kontinuierlichen Austritt von Bakterien und Darminhalt in die Bauchhöhle gewährleistet (Zantl et al., 1998).

Die Entstehung der Sepsis-Symptomatik benötigt bei diesen beiden Modellen einen längeren Zeitraum als beim D-GalN/LPS-Modell und ähnelt so stark der Situation septischer Patienten nach chirurgischen Eingriffen (Remick & Ward, 2005). Dabei imitiert die CASP eher den klinischen Verlauf einer diffusen Peritonitis und der sich langsam daraus entwickelnden SIRS als das Modell der CLP, welches eher ein Modell zur Entwicklung eines intraabdominalen Abszesses mit länger anhaltenden und geringeren Zeichen einer systemischen Inflammation darstellt (Maier et al., 2004).

Ein Nachteil des CASP-Modells ist jedoch die längere Versuchszeit. Außerdem wird ein Teil der Entzündung durch den stark traumatisierenden Eingriff selbst und somit unabhängig von der bakteriellen Belastung verursacht. Ein weiterer Nachteil beider Modelle ist, dass sie schwer standardisierbar sind, da das Ausmaß der fäkalen Kontamination der Peritonealhöhle und somit die bakterielle Herausforderung nicht adäquat kontrollierbar sind. Hinzu kommt, dass die Art der freigesetzten, die Sepsis auslösenden Keime eher schlecht definierbar ist (Wichterman et al., 1980; Freise et al., 2001).

Auch führen zum Beispiel kleine Unterschiede der Größe und Anzahl der Perforationen und der Menge der Flüssigkeitszufuhr zu einer unterschiedlichen klinischen Ausprägung, einem differierenden zeitlichen Verlauf und einer unterschiedlichen 24-Stunden-Überlebensrate (Wichterman et al., 1980; Freise et al., 2001; Otero-Antón et al., 2001). Daraus folgt, dass die Ergebnisse, wie oben bereits erwähnt, eher schlecht reproduzierbar sind bzw. vereinheitlicht werden können (Fink & Heard, 1990).

Die ip. oder iv. Bolusinjektion einer definierten Menge LPS ist das einfachste und am weitesten verbreitete nichtinfektiöse Tiermodell der Sepsis (Horner et al., 2004; Klintman et al., 2004; Masaki et al. 2005; Le Minh, 2007). Es handelt sich hierbei um eine letale Endotoxinämie. Dieses Modell reproduziert viele Charakteristika der gram-negativen Sepsis und sorgt für eine hohe Standardisierung. Die Rolle einzelner Faktoren kann aus dem Gesamtprozess leichter isoliert werden als bei den vorher beschriebenen Modellen (Freise et al., 2001; Wang et al., 2001).

Bakterielle Endotoxine wie LPS induzieren, vermittelt durch das angeborene Immunsystem, eine hochgradige inflammatorische sowie prokoagulatorische Immunantwort und können zu einem letalen septischen Schock der Versuchstiere führen. Aus einer Vielzahl präklinischer Studien geht hervor, dass bei Hemmung des Endotoxins in experimentellen Sepsismodellen ein Überlebensvorteil resultiert. Klinische Studien zeigen, dass Endotoxine in vielen Fällen im systemischen Kreislauf von Sepsispatienten nachweisbar sind (Opal & Glück, 2003).

Das LPS-Sepsis Modell vernachlässigt aber die Vermehrung von Bakterien und deren Zerstörung durch das Immunsystem. Daher wird an diesem Modell immer wieder kritisiert, dass es die klinische Situation der humanen Sepsis nicht ausreichend imitieren kann (Remick & Ward, 2005).

Keines der diskutierten Modelle ist in der Lage, die vollständige Komplexität der Krankheit widerzuspiegeln, so dass durch sie jeweils nur ein kleiner Ausschnitt der Immunpathogenese betrachtet werden kann (Marshall et al., 2005). Allein die speziesspezifischen Unterschiede der anatomischen Verhältnisse und metabolischen Vorgänge erschweren die Übertragung neuer Therapieentwicklungen auf den Menschen.

In Tiermodellen wird außerdem nur selten berücksichtigt, dass Patienten, die eine Sepsis entwickeln, oft ältere Menschen mit vielen Komorbiditäten sind und auf Intensivstationen Antibiotika und unterstützende Therapien, wie Volumensubstitution oder Beatmung, erhalten. Dies ist ein weiterer Grund dafür, dass effektive Therapiestrategien für Sepsispatienten nicht direkt von erfolgversprechenden tierexperimentellen Ergebnissen abgeleitet werden können (Esmon et al., 2004; Rittirsch et al., 2007).

Die Entwicklung einer Funktionsstörung der Leber und des akuten Leberversagens sind eine wesentliche Ursache der Morbidität und Mortalität in Patienten mit gram-negativer Sepsis (Baue, 1994; Livingston & Deitch, 1995). Daher lag das Hauptaugenmerk der hier vorgestellten Studie auf den zellulären Vorgängen speziell in der Leber.

Aus diesem Grund wurde das hier vorliegende Endotoxinmodell gewählt. Vorteil dieser Methode ist, dass die Art des Endotoxins vom Untersucher festgelegt werden kann und der Symptom-Zeitverlauf relativ genau reproduzierbar ist. Hier wurde die Endotoxinämie durch eine einmalige intraperitoneale Injektion des Lipopolysaccharids von E.coli des Serotyps O128:B12 induziert.

Es ist bekannt, dass Nagetiere eine um über das 1000-fache geringere Empfindlichkeit gegenüber LPS aufweisen als Menschen (Leist et al., 1995). Um bei der Maus die Sensitivität

gegenüber LPS zu steigern, wurde zusätzlich D-Galactosamin injiziert. Dieser Aminosucker wird ausschließlich in der Leber metabolisiert, führt dort zu einer selektiven Depletion von Uridinnukleotiden und somit zu einem Transkriptions- und Translationsblock in der Leber. Schon 30-45 Minuten nach Applikation können pathophysiologische und klinische Symptome beobachtet werden (Galanos et al., 1979; Leist et al., 1995). Das Endotoxinmodell ist im Gegensatz zu einem systemischen Modell, wie z.B. das Modell der CLP, ein lokales Modell. Dadurch ist es möglich, speziell die Vorgänge bei der Entwicklung eines septischen Leberorganversagens genauer zu untersuchen.

4.1.1.2 Präparation

Für die Untersuchung der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie war es erforderlich, die Tiere über einen Zeitraum von etwa zwei Stunden (für die Präparation und Mikroskopie) in Narkose zu halten. Dies wurde durch eine Kombinationsnarkose aus Ketamin (75 mg/kg KG ip.) und Xylazin (25 mg/kg KG ip.) ermöglicht.

Zur Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie der Leber ist es notwendig, eine Laparotomie durchzuführen und den linken Leberlappen auszulagern. Um Leberschäden durch Obstruktion von Gefäßen während der Auslagerung der Leber zu vermeiden, wurde diese vorsichtig mit angefeuchteten Wattetupfern (0,9%ige Kochsalzlösung) durchgeführt, ohne die zu mikroskopierende Seite zu berühren. Anschließend wurde die Leber behutsam auf eine spezielle Modelliermasse gebettet.

4.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Die Intravitalmikroskopie (IVM) diente in dieser Studie als Haupt-Untersuchungstechnik. Sie ermöglicht es, physiologische und pathophysiologische Zellinteraktionen direkt darzustellen und diese quantitativ zu beurteilen. Darüber hinaus ist es möglich, Aussagen über den mikrovaskulären Blutfluss zu machen.

Im Vergleich zu indirekten Methoden zur Beurteilung der Lebermikrozirkulation wie z.B. der Flussmessung mittels Laser-Doppler-Verfahren (Arvidsson et al., 1988; Vollmar et al., 1994) oder der Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs (Vollmar et al., 1992; Knudson et al., 2003) kann mittels der Intravitalmikroskopie (Bloch, 1955) das mikrovaskuläre Strombett der Leber direkt visualisiert und entsprechend analysiert werden.

Der große Vorteil der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie gegenüber *ex vivo* Versuchen besteht darin, dass sich physiologische und pathophysiologische Prozesse direkt im lebenden Organismus darstellen lassen und die Zellen somit in ihrem physiologischen Milieu und unter den dort üblichen Bedingungen beobachtet werden können.

Die Intravitalmikroskopie der Leber ist eine weit verbreitete Methode, die zur Untersuchung vieler unterschiedlicher Aspekte angewandt wurde und werden kann, unter anderem zur Analyse der Pathogenese der Arteriosklerose (Eriksson et al., 2001; Siegel-Axel et al., 2006) und mikrovaskulärer Thrombosen (Renné et al., 2006; Sorg et al., 2007), fibrotischer und zirrhotischer Prozesse (Vollmar B et al., 1997b; Nakata et al., 2002), des Diabetes (Lindenblatt et al., 2006; Scalia et al., 2007) und der Tumorentstehung (Klenke et al., 2005; Kollmar et al., 2007). Weiterhin dient diese Technik der Untersuchung von pathophysiologischen Mechanismen bei Ischämie/Reperfusion (Khandoga et al., 2003; Schoen et al., 2007), Inflammation und Sepsis (Hoffmann et al., 2004; Thorlacius et al., 2006) sowie nach Transplantation (Jain et al., 2004; Preissler et al., 2006) oder Trauma (Langer et al., 2005; Amon et al., 2006). Daher bietet sie eine ideale Möglichkeit, die Erkenntnisse der molekularen und zellulären Mechanismen, die aus *in vitro* Versuchen gewonnen werden, *in vivo* zu analysieren und zu überprüfen (Vollmar & Menger, 1998; Menger et al., 1999).

Bisher wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie an vielen unterschiedlichen Spezies, wie an Mäusen (Rappaport, 1977), an Ratten und Hamstern (Menger et al., 1991; Vollmar et al., 1994) an Kaninchen (McCuskey, 1966; Eichhorn et al., 2002; Rücker et al., 2005) sowie an Hunden und Affen (Bloch, 1955; Habazettl et al., 1994) durchgeführt.

Die Intravitalmikroskopie wurde Ende 1930 von Melvin H. Knisely erstmals zur Untersuchung der Mikrozirkulation von mit Malaria infizierten Tieren angewendet (Bloch, 2001). Durch Modifizierung des Modells trat anstelle der Trans-Illuminationstechnik die Epi-Illuminationstechnik (Sherman & Fisher, 1986).

Bei der Trans-Illumination ist das einsehbare Areal limitiert, da sie eine sehr dünne Gewebedicke voraussetzt, so dass sogar bei Nagetieren trotz geringer Leberkapseldicke nur der Leberlappenrand untersucht werden kann. Aus diesem Grund werden bei Studien mit Trans-Illuminationstechnik meist nur wenige Azini untersucht. Hierbei muss man berücksichtigen, dass es durch die Präparation zur Austrocknung und zur mechanischen Manipulation des Leberrandes kommen kann. Weiterhin ist die Perfusion im Randbereich bereits bei Normalbedingungen deutlich eingeschränkt (Eguchi et al., 1991). Daher ist die Aussagekraft dieser Methode eher gering.

Die Epi-Illumination ermöglicht es dagegen, nach Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen

verschiedene Parameter der Lebermikrozirkulation größerer Leberareale darzustellen und diese quantitativ auszuwerten (Menger et al., 1991). Sinusoide und postsinusoidale Venolen, die parallel zur Leberoberfläche verlaufen, können anhand der Intravitalmikroskopie visualisiert werden und nach Analyse Informationen sowohl über die hepatische Mikrozirkulation als auch über zelluläre Mechanismen liefern. Dazu zählen unter anderem die sinusoidale Perfusionsrate, die Sinusoidweite, mikrovaskuläre Leukozytenzahlen und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Zellen (Menger et al., 1991; Vollmar et al., 1996).

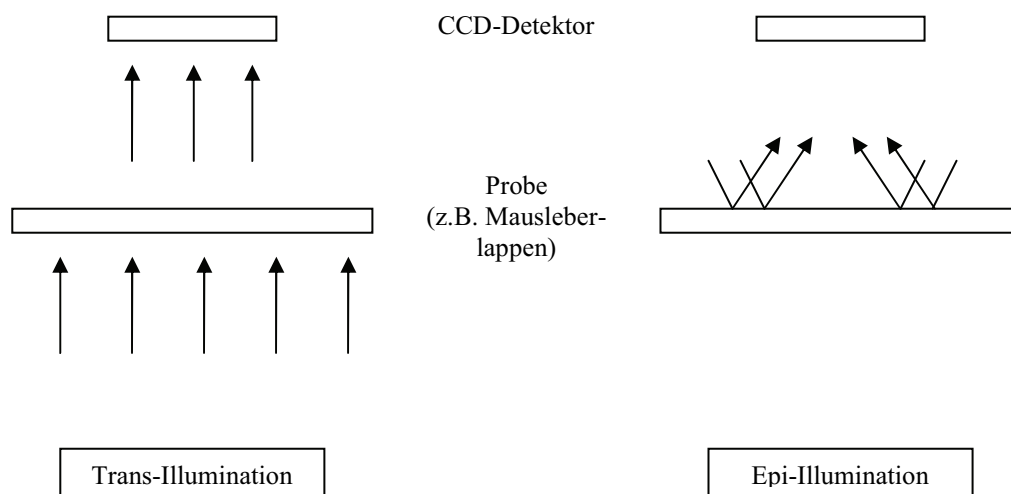


Abb. 16: Lichtstrahlengang bei Trans- und bei Epi-Illumination.

Durch Injektion von Natriumfluoreszein kommt es zu einer Kontrastfärbung des Parenchyms mit Negativkontrastierung des mikrovaskulären Gefäßsystems der Leber. Der Grund dafür ist, dass das Natriumfluoreszein ein niedermolekulares Molekül ist, welches rasch durch das fenestrierte Gefäßendothel der Lebersinusoide in den Extravasalraum dringt und insbesondere von perizentralen Hepatozyten aufgenommen wird. Dadurch kann die Perfusion der Leber quantitativ untersucht werden (Vollmar et al., 1994). Pro Versuchstier wurden zehn Lobuli mikroskopiert und auf Videoband aufgenommen. Bei der nachfolgenden quantitativen „offline“-Analyse wurde nach der Methode von Clemens et al. (1985) eine 200 µm lange virtuelle Linie so gezogen, dass sie die Sinusoide midzonal im rechten Winkel kreuzt. Die Anzahl der Sinusoide, die diese Linie kreuzten und perfundiert bzw. nicht perfundiert waren, wurde bestimmt. Die Angabe der sinusoidalen Perfusion erfolgte in Prozent perfundierter Sinusoide.

Zur Analyse der hepatischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in Sinusoiden und in Venolen wurde der Farbstoff Rhodamin 6G injiziert, welcher zur in vivo Kontrastierung von Leukozyten dient. Er reichert sich selektiv in den Mitochondrien von Leukozyten und

Thrombozyten an. Durch anschließende Epi-Illumination der Leber mit grünem Licht (Anregungswellenlänge 530-560/Emissionswellenlänge >580 nm) (Vollmar et al., 1997a; Eipel et al., 2004) kann die quantitative Analyse des Leukozytenfließverhaltens sowohl in Sinusoiden als auch in postsinusoidalen Venolen durchgeführt werden.

Ein alternatives Verfahren zur Erfassung der Inflammation wäre u.a. die Bestimmung des Myeloperoxidase (MPO)- Gehaltes in der Mausleber. Dieses Enzym wird aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt und kann daher als Parameter zur Beurteilung der Gewebeeinfiltration und Aktivierung neutrophiler Granulozyten herangezogen werden (He et al., 2007; Laschke et al., 2007). Weiterhin kann neben der Bestimmung der Plasmaaktivitäten von ALT und AST auch diejenige des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) eine Aussage über eine Lebergewebsschädigung liefern (Hong et al., 1998). LDH kommt in Form verschiedener Isoenzyme in allen Zellen vor, und ist daher bei vielen unterschiedlichen Erkrankungen, wie z.B. beim Herzinfarkt, bei Hämolyse und bei Lebererkrankungen erhöht. Aus diesem Grund ist die Bestimmung der Plasmakonzentration von LDH weniger spezifisch als ALT und AST. Desweiteren kann zur Erfassung der Intensität der Inflammationsreaktion auch die Bestimmung der Expression des Enzyms iNOS (induzierbare Stickoxid-Synthase) und von Stickstoffmonoxid durchgeführt werden (Escames et al., 2006). Die iNOS wird bei Entzündungsreaktionen durch proinflammatorische Zytokine stimuliert und führt zu einer zytotoxischen Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Konzentration (NO) und somit zu Zelltod und zu Gewebsschädigung. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl weiterer Parameter zur Beurteilung der Inflammation, von denen in dieser Studie eine bestimmte Auswahl zur Anwendung kamen.

Bei einer Leberzellschädigung sind die Aktivitäten der Lebertransaminasen Alaninaminotransferase (ALT) und Aspartataminotransferase (AST) im Plasma erhöht. Dabei korreliert die Höhe des Enzymanstiegs mit dem Ausmaß der Leberzellschädigung. AST ist sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien vorhanden, ALT dagegen ausschließlich im Zytosol. Bei einer schwergradig gestörten hepatozellulären Integrität wie bei der Zellnekrose sind neben zytoplasmatischen Enzymen auch mitochondriale Enzyme im Plasma nachweisbar. Die Aktivitäten der zytoplasmatischen Enzyme im Plasma spiegeln eine akute Anoxie-bedingte Freisetzung wider, welche aber nicht unabdingbar auf einen Zelltod schließen lassen (Nishimura et al., 1986; Kamiike et al., 1989). Auch bei reversiblen Zellschädigungen kommt es zur vesikulären Freisetzung zytoplasmatischer Enzyme, so dass

diese auch zum Nachweis der Beurteilung eines akuten Zellschadens herangezogen werden können.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Wirkung von ALP bei Endotoxinämie

Bei der Sepsis wird eine komplexe immuno-inflammatorische Kaskade in Gang gesetzt. Dabei treten Mechanismen der Entzündung, der Gerinnungsaktivierung, Endotheldysfunktionen und Mikrozirkulationsschädigungen in Wechselwirkung miteinander. Die Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation der inflammatorischen Antwort auf infektiöse Stimuli. Obwohl die genauen Mechanismen der Pathogenese der Leberdysfunktion nicht vollständig geklärt sind, wird immer deutlicher, dass der apoptotische Zelltod eine entscheidende Rolle bei der inflammatorischen Antwort spielt (Weber et al., 2004).

In vitro wurde anhand eines Mausmodells bereits gezeigt, dass Immunfunktionen in Mäusen durch Antileukoproteinase (ALP) beeinflusst werden, und zwar durch Unterdrückung der inflammatorischen Antwort der Makrophagen sowie durch Erhöhung der Resistenz gegenüber Lipopolysaccharid (Taggart et al., 2002).

Die vorliegenden Ergebnisse dieser experimentellen Studie bestätigen, dass sich der Einsatz von ALP bei Endotoxinämie günstig auf die inflammatorische Immunantwort auswirkt, da es die Immunantwort modifizieren und den damit einhergehenden nekrotischen Leberschaden deutlich verringern konnte. Dies ist dadurch belegt, dass die Applikation von ALP zu einer leichten Verbesserung der durch D-GalN/LPS verursachten Perfusionsstörung, zu einer deutlich herabgesetzten hepatischen Leukozytenakkumulation sowie zu einer signifikanten Reduktion der Leberenzymaktivitäten (ALT und AST) führte (siehe Abb. 8 A, B, C und Abb. 12 A, B). Weiterhin führte die Injektion von ALP zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl NFκB-p65 positiver Zellen, welche außerdem hauptsächlich auf das zytosolische Kompartiment der Hepatozyten beschränkt war (siehe Abb. 13 A, B). In diesem Zusammenhang waren auch die Plasmakonzentrationen der durch die Aktivierung von NFκB freigesetzten Zytokine TNF-α und IL-10 deutlich reduziert (siehe Abb. 14 A, B).

Somit bestätigt diese Studie, dass der modulierende Effekt von ALP auf eine Interferenz mit dem Stoffwechselweg von NFκB zurückgeführt werden kann, da ALP anhand eines noch

unbekannten Mechanismus den Abbau von I κ B β , einem wichtigen zytosolischen Inhibitor von NF κ B, und somit auch die Umwandlung von NF κ B in seine aktive Form hemmt (Taggart et al., 2002; Ward & Lentsch, 2002).

4.2.2 Regulation von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen durch ALP bei Endotoxinämie

4.2.2.1 Regulation von NF κ B

Der Transkriptionsfaktor NF κ B gehört zu den zentralen Mediatoren bei der Induktion der systemischen inflammatorischen Antwort durch LPS. NF κ B ist ein dimerisch zusammengesetzter Faktor und besteht aus fünf Rel-Proteinen: RelA (p65), RelB und cRel sowie p50 und p52, welche Homo- oder Heterodimere miteinander bilden können. Die hauptsächlich aktive Form von NF κ B ist das Heterodimer aus p50 oder p52 und p65, welche die für die Induktion der Gentranskription nötigen Transaktivierungsdomänen beinhaltet (Tak & Firestein, 2001).

Heterodimere aus p50 und p65 sind wichtige Faktoren bei der Aktivierung inflammatorischer Gene durch TNF- α und IL-1 in Monozyten und diese Wirkungen werden durch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 gehemmt (Schottelius et al., 1999).

In unstimulierten Zellen befindet sich NF κ B nicht-kovalent an inhibitorische Mitglieder der I κ B-Familie gebunden im Zytoplasma, so dass die Sequenzen, die für eine Translokation von NF κ B ins Zytoplasma nötig sind (sog. Nuclear localization sequence, NLS), „maskiert“ sind. Bei Einwirkung einer Reihe proinflammatorischer Signale, unter anderem Zytokine wie TNF- α und IL-1 β , Bakterientoxine wie LPS aber auch reaktiver Sauerstoffradikale, kommt es rasch zur Phosphorylierung, Ubiquitynylierung und zum Abbau von I κ B α durch I κ B-Kinasen (IKK) und somit zu einer Aktivierung von NF κ B, welches daraufhin in den Nukleus transloziert und dort die Transkription einer großen Auswahl NF κ B-abhängiger proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 α und IL-1 β bewirkt (Karin et al., 2000; Zingarelli et al., 2003; Gadjeva et al., 2004;). Gleichzeitig kommt es zur Expression von Adhäsionsproteinen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin), Chemokinen (z.B. KC, Keratinocyte derived chemokine), Koagulationsfaktoren (Tissue Factor, Tissue factor pathway inhibitor) und weiterer

Mediatoren (Stickoxid (NO)-Synthase, Cyclooxygenase-2), welche mit der bei Sepsis induzierten Inflammationsantwort assoziiert sind (Abraham, 2003).

Daher kann nach Aktivierung von NF κ B die Inflammationsantwort durch folgende Mechanismen aggraviert werden:

- deutlich erhöhte Expression proinflammatorischer Mediatoren und
- durch Verlängerung der Überlebenszeit von Neutrophilen, welche ihrerseits proinflammatorische Moleküle freisetzen (Abraham, 2003).

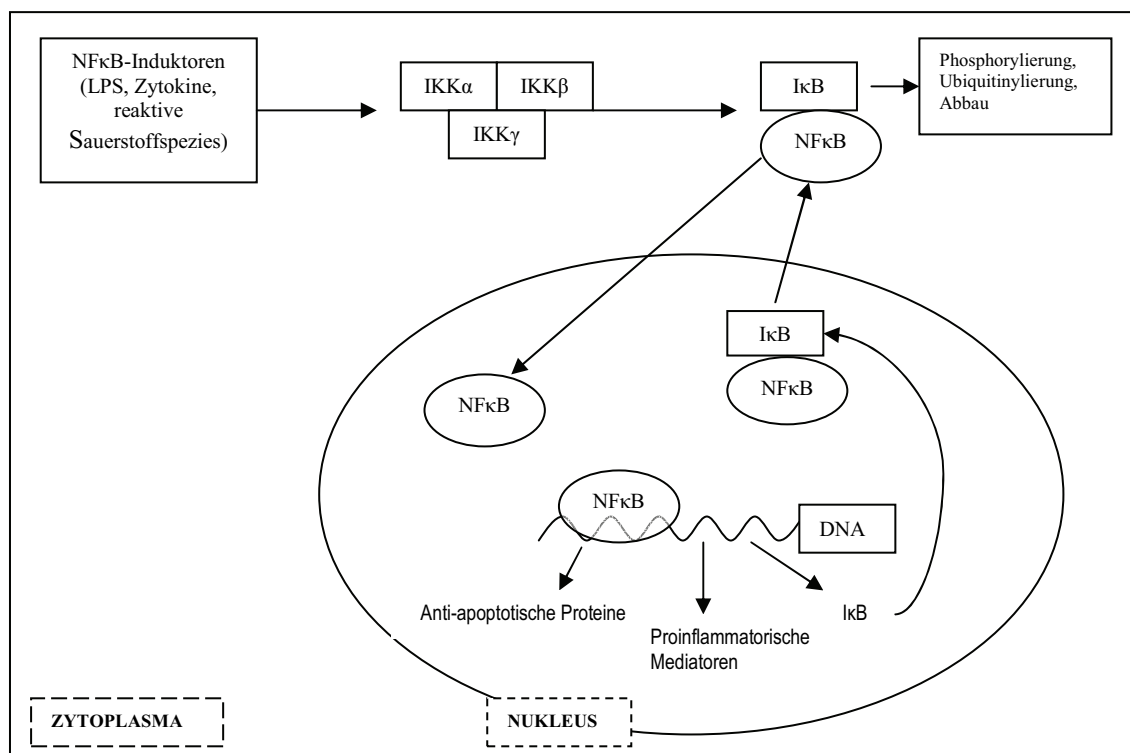


Abb. 17: Aktivierung von NF κ B. Eine Vielzahl von Mediatoren führt zur Aktivierung des I κ B-Kinase (IKK)-Komplexes, welches daraufhin I κ B phosphoryliert. Dies führt zum Abbau von I κ B, so dass NF κ B freigegeben wird. NF κ B transloziert in den Nukleus, bindet dort an spezifische Promotorregionen und initiiert somit die Transkription einer Vielzahl verschiedener Proteine und Mediatoren sowie seines eigenen Inhibitors I κ B, welcher NF κ B bindet, dieses ins Zytoplasma zurücktransportiert und somit NF κ B wieder inaktiviert. (Modifiziert nach Abraham, 2003; S.366).

Aktiviertes NF κ B induziert nicht nur die Expression proinflammatorischer Gene, sondern auch die Expression seines eigenen Inhibitors I κ B α . Das neu produzierte I κ B α bindet im Nukleus an NF κ B und sorgt somit für die Inaktivierung und den Rücktransport von NF κ B in das Zytoplasma.

Die Anzahl NFκB-p65 positiver Zellen in Lebergewebe von mit D-GalN/LPS-vorbehandelten Tieren war, verglichen mit Kontrolltieren, mit hauptsächlichlicher Lokalisation von NFκB im Nukleus, deutlich erhöht. Dagegen wurde durch Injektion von ALP zum einen die Anzahl NFκB-p65 positiver Zellen signifikant reduziert. Zum anderen war die Expression vorwiegend auf das Zytoplasma der Hepatozyten begrenzt (siehe Abb. 13 A, B). In diesem Zusammenhang kann, wie oben bereits erwähnt, bestätigt werden, dass ALP in den Signalweg von NFκB eingreift. Durch die zytoplasmatische Restriktion dieses Faktors kommt es anschließend zur Hemmung der Freisetzung von nachfolgenden Signalen wie TNF-α und IL-10 (siehe Abb. 14 A, B). Dies entspricht vergleichbaren Auswirkungen auf durch Zytokine aktivierte Endothelzellen, da es durch die Unterdrückung der NFκB-Aktivität auch zu einer Hemmung der Hochregulation der E-Selektin Expression kommt (Sehnert et al., 2006). Selektine sind wichtig für die Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit der Leukozyten, um diesen zu ermöglichen, für einen bestimmten Zeitraum in engem Kontakt mit den Endothelzellen zu treten, bevor sie fest mit diesen adhären und anschließend transmigrieren (Kunkel & Ley, 1996). Entsprechend war in dieser Studie die venuläre Leukozytenadhärenz in ALP-vorbehandelten Tieren, verglichen mit denen der G-L-Gruppe, signifikant reduziert.

4.2.2.2 Folgen der Hemmung von NFκB

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Dauer der NFκB-Aktivierung sowie der Höhe der Konzentration zirkulierender NFκB-abhängiger proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF-α, IL-1) einerseits und einer daraus resultierenden Verschlechterung des klinischen Ergebnisses andererseits (Abraham, 2003).

Da bekannt ist, dass die Exposition von Tieren gegenüber LPS oder Bakterien in vielen verschiedenen Organen eine Aktivierung von NFκB verursacht, wurden mehrere Versuche durchgeführt, die nukleäre Translokation von NFκB zu verhindern, mit dem Ziel, einen Schutz vor Gewebsschädigung bei Sepsis zu induzieren (Abraham, 2003; Zingarelli et al., 2003). Damit einhergehend wurde bereits gezeigt, dass eine Hemmung der NFκB-Aktivierung akute inflammatorische Prozesse, Organdysfunktionen und Letalität verringert (Abraham, 2003). Bei Blockade der Translokation von NFκB in den Nukleus führt die Injektion des NFκB-abhängigen Zytokins TNF-α wiederum zur Apoptose von Hepatozyten (Chaisson et al., 2002).

In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass auch die Hemmung von TNF- α , z.B. durch die Gabe von neutralisierenden TNF- α -Antikörpern, zu einem besseren Überleben in Tiermodellen der Endotoxämie führt. Klinische Studien zur therapeutischen Applikation dieser TNF- α -Antikörper bei Sepsis zeigten jedoch keine Verbesserung der Überlebensrate der Versuchspersonen (Böhler et al., 1997).

Taggart et al. (2005) haben auf der Grundlage von Erkenntnissen aus *in vitro* Versuchen berichtet, dass ALP auf Grund seiner kationischen Eigenschaften an negativ geladene DNA-Regionen binden und dabei spezifische NF κ B-Genloci besetzen kann, mit der Folge der Hemmung der Transkriptionsaktivität dieses Faktors in Monozyten. Dabei bindet ALP gezielt an NF κ B-reiche TNF- α -Promotorregionen.

Die vorliegende Studie bestätigt den antiinflammatorischen Effekt von ALP, da die Parameter, welche primär durch ALP beeinflusst werden, diejenigen Faktoren sind, die mit NF κ B-abhängiger Inflammation assoziiert sind. Durch Hemmung der Aktivierung von NF κ B kommt es nachfolgend zu deutlich reduzierten Plasmaspiegeln der NF κ B-abhängigen Transkriptionsfaktoren wie TNF- α und IL-10. Durch Applikation von ALP erreichten die Plasmakonzentrationen dieser Transkriptionsfaktoren nahezu Kontrollwerte, während sie in D-GalN/LPS-Tieren deutlich erhöht waren (siehe Abb. 14 A, B).

Es gibt einige Hinweise darauf, dass sich eine Unterdrückung der NF κ B-Aktivität auch negativ auf den Wirtsorganismus auswirken kann (Sha et al., 1995; Gjertsson et al., 2001), da NF κ B eine wichtige Komponente ist, um eine ausreichende Reaktion des Wirtsorganismus auf Toxine zu erzeugen. So hatte die Hemmung von NF κ B in einem durch Staphylokokken induzierten Arthritis-Modell keine vorteilhaften Auswirkungen in Bezug auf die Mortalität oder das Ausmaß der Gelenkschädigung. Ebenso wurde die bakterielle Belastung durch die unterdrückte Abwehr verstärkt (Gjertsson et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inhibition der NF κ B-Aktivität, die Fähigkeit des Immunsystems *Listeria monocytogenes* zu eliminieren, beeinträchtigt und die Empfindlichkeit gegenüber einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* erhöht (Sha et al., 1995).

Darüber hinaus induziert eine bakterielle Stimulation die Hepatozyten, entweder direkt oder auch über nicht-parenchymale Zellen, NF κ B-abhängige Zytokine zu exprimieren, welche für die Aktivierung bakterizider Zellen wichtig sind. Daher scheint die Induktion der Aktivität dieses Transkriptionsfaktors essentiell für die Eliminierung von Bakterien unter anderem innerhalb der Leber zu sein (Lavon et al., 2000; Das, 2003). Damit einhergehend konnte in

dieser Studie in den mit ALP vorbehandelten Tieren durch Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B kein Überlebensvorteil beobachtet werden. Die hohe Letalität der Versuchstiere mit einem durch D-GalN/LPS induzierten akuten Leberschaden konnte durch Injektion von ALP nicht wesentlich beeinflusst werden (siehe Abb. 15).

Weiterhin spielt NF κ B eine wichtige Rolle bei der Expression antiinflammatorischer Proteine (Ghosh et al., 1998), wie beispielsweise von IL-10, durch Aktivierung ihrer Transkription (Mori & Prager, 1997; Holmes et al., 2003; Gringhuis et al., 2007). Dementsprechend war in dieser Studie im Plasma von ALP-vorbehandelten Tieren durch Hemmung der Aktivität von NF κ B eine deutliche Senkung der IL-10-Konzentration fast bis auf Kontrollniveau sichtbar. In D-GalN/LPS-vorbehandelten Tieren hingegen war die Konzentration dieses antiinflammatorischen Mediators um ca. das 7-fache erhöht nachweisbar (siehe Abb. 14 B).

4.2.2.3 IL-10 - ein wichtiger Gegenregulator der inflammatorischen Reaktion

IL-10, ein antiinflammatorisches Zytokin, ist als ein Inhibitor der Aktivierung von NF κ B beschrieben. In humanen Monozyten wurde beobachtet, dass IL-10 auf zwei verschiedenen Wegen die Gentranskription durch NF κ B unterdrückt: zum einen durch die Hemmung der Aktivität von IKK und zum anderen durch Hemmung der Bindung von NF κ B an die DNA (Zingarelli et al., 2003).

Dies führt zu einer veränderten Transkription und gleichzeitig auch zur Stabilität spezifischer messenger RNAs (DiPrio, 1997; Hamiton et al., 2002).

Somit gilt IL-10 als wichtiger Faktor in der Gegenregulation proinflammatorischer Gene, dessen Freisetzung durch LPS-Stimulation in Makrophagen induziert wird. Damit einhergehend wurde beobachtet, dass in septischen Patienten erhöhte IL-10 Plasmakonzentrationen messbar sind, wobei diese in Patienten mit septischem Schock deutlich erhöht waren. In gesunden Patienten ohne eine Infektion war IL-10 dagegen nicht detektierbar (Marchant et al., 1994).

Wie bereits berichtet, führte die Applikation von ALP in D-GalN/LPS-vorbehandelten Tieren zu einer deutlichen Reduktion der Plasmakonzentration von IL-10. Um zu untersuchen, ob diese signifikante Herunterregulation von IL-10 eine Ursache der hohen Letalität der Tiere der ALP-Gruppe sein könnte, führten wir eine Überlebensstudie durch, bei der D-GalN/LPS- und ALP-vorbehandelten Tieren zusätzlich ein IL-10-Fc Fusionsprotein appliziert wurde.

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass endogen produziertes und exogen appliziertes IL-10 das Ausmaß der inflammatorischen Antwort primär in Modellen des endotoxämischen und bakteriellen Schocks reduzieren und das Ergebnis verbessern kann (Oberholzer et al., 2002). Entsprechend zeigte unsere Untersuchung, dass die Applikation dieses Fusionsproteins zu einer leichten Tendenz in Richtung eines Überlebensvorteils führte (siehe Abb. 16). IL-10 scheint jedoch nicht der einzige protektive Faktor dieses komplexen Szenarios zu sein, und konnte daher in diesem Experiment die Letalität nicht signifikant senken.

4.2.2.4 Wirkung von D-Galactosamin auf Transkription und Translation

Bei Einwirkung von D-GalN/LPS werden apoptotischer Leberschaden und Letalität hauptsächlich von TNF- α abhängigen Signalen induziert (Mignon et al., 1999; Nowak et al., 2000). Daher hätte eine signifikante Reduktion von Apoptose in ALP-behandelten Mäusen erwartet werden können. Dennoch war, verglichen mit Kontrolltieren, ein massiver Anstieg der Aktivität von Cleaved Caspase-3 in D-GalN/LPS-Mäusen mit und ohne zusätzliche Applikation von ALP in ähnlichem Maße zu beobachten (siehe Abb. 11). Auch die quantitative Analyse TUNEL-positiver Zellen zeigte, dass die Anzahl sowohl TUNEL-positiver Hepatozyten als auch TUNEL-positiver nicht-parenchymatöser Zellen in Tieren der G-L-Gruppe deutlich erhöht war, und durch ALP nicht wesentlich reduziert werden konnte (siehe Abb. 10). Dies spiegelt die massiv erhöhte Induktion von Apoptose wider.

D-GalN ist ein Aminozucker, welcher ausschließlich in Hepatozyten metabolisiert wird und schon eine halbe Stunde nach seiner Injektion zu einer selektiven Depletion von Uridinnukleotiden mit schwerer Transkriptions- und Translationshemmung führt (Leist et al., 1995). Die Senkung der Synthese von RNA oder Proteinen in der Leber um ca. 50% sensibilisiert dieses Organ gegenüber der Einwirkung von TNF- α und LPS (Leist et al., 1995). TNF- α und LPS wiederum aktivieren NF κ B durch Freisetzung vom zytoplasmatischen Inhibitorprotein I κ B β , so dass NF κ B in den Zellkern transloziert. Tapalaga et al. (2002) haben beschrieben, dass 2,5 Stunden nach Gabe von D-GalN/TNF- α die höchsten Konzentrationen von NF κ B im Nukleus nachweisbar sind. Nach ca. 4,5 Stunden kommt es zu einem unvollständigen Rücktransport ins Zytoplasma, da ca. 30% der NF κ B-Fraktion im Nukleus verbleiben. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Studie 6 Stunden nach Injektion von D-GalN/LPS eine massive Erhöhung der NF κ B-p65-Immunfärbung hepatozellulärer Zellkerne beobachtet. Die Gabe von ALP konnte die Anzahl NF κ B-p65 positiver hepatozellulärer Nuklei deutlich reduzieren, wobei die Anfärbung außerdem vornehmlich auf

das Zytoplasma der Hepatozyten beschränkt war (siehe Abb. 13 A, B). Daraus lässt sich schließen, dass ALP die Aktivierung und die Translokation von NFκB in den Nukleus hemmt. Damit ging jedoch keine Reduktion apoptotischer Zellen einher. Dies könnte bedeuten, dass der apoptotische Zelltod zumindest teilweise durch NFκB-unabhängige Mechanismen vermittelt wird.

Darüber hinaus kann man vermuten, dass die zur Apoptose führende Signalkaskade bereits in Gang gesetzt wurde, bevor NFκB in das Zytoplasma zurück transportiert wurde. Dies bestätigt auch die Beschreibung von D. Malinska, dass sich die Zelle in einer irreversiblen Phase des physiologischen Abbaus befindet, sobald die Signalkaskade der Apoptose in Gang gesetzt wurde (Maslinska, 2003). Der apoptotische Zelltod unterliegt einer strengen Kontrolle durch komplexe Regulationsmechanismen, die auch überlebensfördernde Signale freisetzen. Bei Dysregulation der Apoptose kommt es zu degenerativen Prozessen (Jin & El-Deiry, 2005).

4.2.3 Auswirkung von ALP auf den apoptotischen Zelltod

Unter Apoptose versteht man den physiologischen Prozess des programmierten, durch Genexpression gesteuerten Zelltodes, welcher unter anderem der Entfernung defekter Zellen dient (Sanfilippo & Blaho, 2003). Durch Stimuli innerhalb und außerhalb der Zelle wird über eine Vielzahl verschiedener, voneinander unabhängiger Signalwege die Apoptose induziert (Strasser et al., 2000; Fan et al., 2005). Diese Signalkaskaden führen zur Aktivierung sog. Caspasen, einer Familie von aspartat-spezifischen Zystein-Proteasen, welche bei der Induktion des apoptotischen Zelltodes eine Schlüsselrolle besitzen. Da es im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einer Auflösung der Zellmembran kommt, werden bei der Apoptose keine schädlichen Zellsubstanzen freigesetzt und somit keine oder nur geringe Entzündungsreaktionen ausgelöst. Morphologisch kommt es zur Zellkernschrumpfung, Chromatinkondensation und zur Bildung membranumschlossener Vesikel, die sich von der Zelle abschnüren. Schließlich werden die sterbenden Zellen abgebaut und von Makrophagen oder Nachbarzellen durch Phagozytose abgeräumt (Strasser et al., 2000).

Obwohl der apoptotische Prozess zunächst als nicht-inflammatorischer Vorgang ohne Einwirkung auf die Gewebeintegrität beschrieben wurde, ist inzwischen klar, dass Apoptose bei pathophysiologischen Ereignissen unkontrolliert und nicht mehr selektiv stattfindet. In diesem Zusammenhang kann es unter anderem zu starken Lebergewebsschäden kommen (Canbay et al., 2003).

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass apoptotische Hepatozyten während einer Endotoxinämie *in vivo* als Signal zur Induktion der Neutrophilenmigration wirken und so den darauf folgenden Angriff auf das Gewebe veranlassen. Deswegen muss der apoptotische Zelltod als relevanter Sachverhalt bei Leberschaden berücksichtigt werden (Lawson et al., 1998). Daher ist auch die sofortige Phagozytose von Apoptosezellen wichtig, um eine Initiation der inflammatorischen Antwort und die anschließende Freisetzung gewebebeschädigender Moleküle zu vermeiden (Dini et al., 1995).

Weiterhin kann eine überhöhte Apoptose von Lymphozyten bei Sepsis schädliche Effekte haben, da daraus ein Fehlen an Lymphozyten resultiert, welche essentiell wichtig für die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen sind (Hotchkiss et al., 1999).

Obwohl in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass ALP teilweise einen günstigen Einfluss auf NFκB-abhängige inflammatorische Prozesse hat, konnte ALP die Zunahme TUNEL-positiver Hepatozyten, TUNEL-positiver nicht-parenchymatöser Zellen sowie erhöhte Caspase-3-Spiegel nicht verhindern. Dagegen wurden die Plasmaaktivitäten der Transaminasen ALT und AST, die 6 Stunden nach Injektion von D-GalN/LPS, verglichen mit Kontrolltieren, massiv erhöht waren, durch ALP-Applikation deutlich reduziert. Trotz der Tatsache, dass die Tiere der ALP-Gruppe reduzierte Enzym Spiegel von ALT und AST aufwiesen, resultierte hieraus kein Überlebensvorteil. Daraus kann man schließen, dass die Tiere letztendlich an massiver Apoptose und nicht an Nekrose starben.

Leukozyten spielen bei der Reaktion des Wirtsorganismus auf Infektionen eine wichtige Rolle. Es kommt zu ihrer sofortigen Aktivierung, Migration und schließlich Elimination des Infektionserregers. Dennoch verursachen diese aktivierten Leukozyten durch Freisetzung verschiedener toxischer Mediatoren bei Inflammation Gewebeschäden (Jaeschke & Smith, 1997), denn nach Transmigration der Leukozyten kommt es zu einem Angriff auf parenchymale Leberzellen und auch zu nekrotischem Leberschaden (Eipel et al., 2004).

Zusammenfassend könnte der nur teilweise günstige Effekt von ALP auf D-GalN/LPS-induzierte Endotoxinämie auf folgende Ursachen zurückzuführen sein:

- Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren
- Mediatoren, welche unabhängig von Transkription durch NFκB wirksam werden
- die zur Apoptose führende Signalkaskade wurde bereits in Gang gesetzt, bevor NFκB in das Zytoplasma zurück transportiert wurde

- eine Hemmung der Expression antiinflammatorischer Gene (z.B. IL-10) durch Reduktion der Aktivität von NFκB.

NFκB hat die Fähigkeit auch zytoprotektive Gene der „inhibitor of apoptosis“ (IAP)-Familie zu aktivieren, welche als anti-apoptotische Faktoren agieren und somit TNFα-induzierter Apoptose vorbeugen (Chu et al., 1997; Tapalaga et al., 2002). Stickoxid (NO), welches über die induzierbare NO-Synthase synthetisiert wird und andere Hemmer der Apoptose (z.B. cIAP1 und cIAP2) sind durch NFκB regulierte Gene, welche das Zellüberleben modifizieren (Dijkstra et al., 2002). Daher könnte die Hemmung von NFκB in ALP-vorbehandelten Tieren zu einem Fehlen seiner anti-apoptotischen Wirkung führen und somit zum Verlust des Schutzes vor Apoptose. Daneben ist NFκB wesentlich an der Auflösung der Inflammation durch Regulation des apoptotischen Zelltodes von Leukozyten beteiligt (Lawrence et al., 2001). Die Beseitigung von apoptotischen Leukozyten durch Makrophagen begrenzt die Halbwertszeit der Leukozyten und ihre schädlichen gewebezerstörenden Effekte. In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass ALP unabhängig von seiner antiproteolytischen Wirkung die Aktivierung von Makrophagen durch LPS hemmt (Yang et al., 2005).

Obwohl die anfängliche Aktivierung von NFκB in Leukozyten mit proinflammatorischer Genexpression einhergeht, kommt es später zur Expression antiinflammatorischer Gene und zur Induktion von Apoptose (Lawrence et al., 2001). Hinzu kommt, dass NFκB das Vermögen besitzt, mehrere LPS-induzierbare proinflammatorische Gene zu hemmen (Gadjeva et al., 2004).

Daher liegt die Vermutung nahe, dass die vorteilhafte Wirkung von ALP, nämlich die lokale Inhibition aggressiver Leukozyten-abhängiger Mediatoren, durch die länger vorhandene gewebebeschädigende Wirkung von Leukozyten infolge der ALP-induzierten Hemmung von NFκB neutralisiert wird.

Aus diesem Grunde wäre eine Modifikation der Funktion von NFκB anstatt einer vollständigen Hemmung dieses Faktors anzustreben, um eine intakte inflammatorische Antwort zu ermöglichen, welche essentiell ist, um normale Verteidigungsmechanismen des Organismus gegen infektiöse Stimuli aufrecht zu erhalten.

4.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass ALP durch eine Hemmung der NF κ B-Aktivität effektiv gegen eine unverhältnismäßig starke D-GalN/LPS-induzierte inflammatorische Antwort schützt. Dies eröffnet somit neue Möglichkeiten für zukünftige Entwicklungen von Therapeutika, die gegen inflammatorischen Gewebeschaden wirksam sind.

Dennoch scheint die Deaktivierung von Proteasen bei pathologischen Prozessen, welche vor allem durch apoptotischen Zelltod als vorherrschende Form des Zelltodes charakterisiert sind, inadäquat zu sein.

Wichtig bei der Entwicklung neuer gezielter Therapien ist es, einen Wirkstoff zu finden, welcher die Balance zwischen der Antiinflammation einerseits und dem Eingriff in normale Zellfunktionen andererseits erreicht. Durch eine selektive funktionelle Modifikation des Transkriptionsfaktors NF κ B, der I κ B Proteine oder von Kinasen, könnte man eine Überexpression dieser Faktoren hemmen, die systemische Toxizität minimieren und somit eine therapeutische Effektivität erzielen.

Weiterhin ist es wichtig, eine antiinflammatorische Therapie zur richtigen Zeit und in der richtigen Dosis zu verabreichen. Ansonsten besteht die Gefahr, diese während der Immunsuppression in der späten Phase der Sepsis zu applizieren. Damit würde es zu einer Unterdrückung der noch vorhandenen Restaktivität der angeborenen Immunität kommen, welche normalerweise dafür sorgt, dass zu diesem Zeitpunkt auch eine erneute Attacke von Bakterien noch abgewehrt werden kann.

Da eine Vielzahl verschiedener Mediatoren an der Pathogenese der Sepsis beteiligt ist, scheint es nicht ausreichend, eine einzige Substanz therapeutisch zu applizieren. Vielmehr wäre es sinnvoller, eine Kombination verschiedener Therapieoptionen anzuwenden, um einen optimalen Behandlungserfolg zu erzielen.

Obwohl dieses Modell nicht direkt auf klinische Situationen übertragen werden kann, konnten die Ergebnisse doch verdeutlichen, dass eine gewisse Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B erforderlich ist, um die klinischen Folgen und das Ergebnis der Sepsis positiv zu beeinflussen.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diesen interessanten Sachverhalt zu klären, der aus dieser Studie hervorgegangen ist, da die Spannweite der Wirkungen von ALP in antiinflammatorischer und antiinfektiöser Hinsicht sehr groß und vielfältig ist.

Es ist möglich, dass sich eine Applikation von ALP in der Therapie des akuten septischen Leberversagens als nützlich herausstellt, da ihre Applikation in diesem Experiment zu einer Modulation der Immunantwort und zu einer deutlichen Verbesserung der Leberintegrität geführt hat.

5. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Vereinfachte Darstellung der Vorgänge bei der angeborenen inflammatorischen Immunantwort auf einen Infektionserreger und Gewebeschaden.
- Abb. 2:** Strukturformel von LPS.
- Abb. 3:** Tertiärstruktur der Antileukoproteinase.
- Tabelle 1:** Übersicht über das Vorkommen von ALP in verschiedenen humanen Geweben.
- Abb. 4:** Schemazeichnung zum Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.
- Abb. 5:** Schema der Versuchsanordnung.
- Abb. 6:** Intravitalmikroskopisches Bild der Mikrozirkulation der Leber in 465-facher Vergrößerung nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Natriumfluoreszein.
- Abb. 7:** Repräsentative intravitalmikroskopische Bilder des Lebergewebes von Kontrolltieren, Tieren der G-L-Gruppe sowie denen der G-L/ALP-Gruppe nach Kontrastverstärkung durch Natriumfluoreszein (**A**) sowie nach Anfärbung von Leukozyten durch Injektion von Rhodamin 6G in Sinusoiden (**B**) und in Venolen (**C**).
- Abb. 8:** Quantitative Analyse des sinusoidalen Perfusionsversagens (**A**), der sinusoidalen Leukozytenstase (**B**) und der venulären Leukozytenadhärenz (**C**) in Tieren mit akutem Leberschaden (G-L), in Tieren mit zusätzlicher Injektion von ALP (G-L/ALP) sowie in der Kontrollgruppe (KON).
- Abb. 9:** Repräsentative histologische Bilder des Lebergewebes nach Anfärbung mit H.-E. in 40-facher Vergrößerung.
- Abb. 10:** Repräsentative Bilder eines Kontroll- (**A**), eines D-GalN/LPS- (**B**) und eines D-GalN/LPS/ALP-vorbehandelten Tieres (**C**) sowie quantitative Analyse der TUNEL-Histologien, angegeben als TUNEL-positive Zellen pro mm^2 bei gleichzeitiger Differenzierung zwischen parenchymatösen (**D**) und nicht-parenchymatösen Apoptosezellen (**E**).
- Abb. 11:** Repräsentative Western Blot-Analyse sowie densitometrische Analyse der Proteinexpression von Cleaved Caspase-3 nach Normalisierung auf die entsprechenden β -Aktin-Signale in Tieren mit akutem Leberschaden (G-L), in Tieren mit zusätzlicher Injektion von ALP (G-L/ALP) sowie in der Kontrollgruppe (KON).
- Abb. 12:** Aktivitäten von ALT (**A**) und AST (**B**) im Plasma 4 und 6 Stunden nach Induktion eines akuten Leberschadens ohne (G-L, schwarz) und mit Injektion von ALP (G-L/ALP, grau) sowie in der Kontrollgruppe (KON, weiß).
- Abb. 13:** Quantitative Analyse der NF κ B-Immunhistochemien, angegeben als Anzahl NF κ B-p65-positiver Hepatozyten/ mm^2 (**A**) sowie repräsentative immunhistochemische Bilder eines Kontroll-, eines D-GalN/LPS- und eines D-GalN/LPS/ALP-vorbehandelten Tieres (**B**).

Abb. 14: Plasmakonzentrationen von TNF- α (A), IL-10 (B) und IL-5 (C) in Tieren der Kontrollgruppe (KON), der G-L-Gruppe und der G-L/ALP-Gruppe.

Abb. 15: Überlebenskurve von Tieren nach G-L- bzw. G-L/ALP-Behandlung.

Abb. 16: Überlebenskurve von Tieren nach G-L- und G-L/ALP-Behandlung sowie nach G-L/ALP-Behandlung mit zusätzlicher Applikation von IL-10.

Abb. 17: Lichtstrahlengang bei Trans- und bei Epiillumination.

Abb. 18: Aktivierung von NF κ B.

6. HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ALP	Antileukoproteinase
ALT	Alaninaminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartataminotransferase
CCD	Charged Coupled Device
D-GalN	D-Galactosamin
ip.	Intraperitoneal
iv.	Intravenös
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
I κ B	Inhibitory kappa B
KG	Körpergewicht
LBP	LPS-Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
Min	Minute
MODS	Multiple Organ Distress Syndrome
NF κ B-p65	Nuklear Factor kappa B-phospho 65
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
SEM	Standard Error of the Means
SIRS	Systemic Inflammatory Respiratory Syndrome
TLR-4	Toll-like Receptor 4
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TUNEL	Terminal transferase dUTP Nick End Labeling
U/min	Umdrehungen pro Minute

7. LITERATUR

- Abraham, 2003. Abraham E. Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis.* 2003; 187:S364-9.
- ACCP/SCCM Consensus Conference, 1992. 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; 20:864-74.
- Adukauskiene et al., 2006. Adukauskiene D, Rimdeika R, Vitkauskiene A, Pilvinis V, Cicinskaite I. The new aspects of treatment of severe sepsis and septic shock. *Medicina (Kaunas).* 2006; 42:265-72.
- Alexander et al., 2001. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001; 7:167-202.
- Amon et al., 2006. Amon M, Laschke MW, Harder Y, Vollmar B, Menger MD. Impact of severity of local soft-tissue trauma on long-term manifestation of microcirculatory and microlymphatic dysfunctions. *J Trauma.* 2006; 61:924-32.
- Angus et al., 2001. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29:1303-10.
- Angus & Wax, 2001. Angus DC & Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 2001; 29:S109-16.
- Annane et al., 2004. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for treating severe sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; CD002243.
- Arvidsson et al., 1988. Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol.* 1988; 254:G471-6.
- Balci et al., 2003. Balci C, Sungurtekin H, Gürses E, Sungurtekin U, Kaptanoglu B. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Crit Care.* 2003; 7:85-90. Epub 2002.
- Balk & Bone, 1989. Balk RA, Bone RC. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Crit Care Clin.* 1989; 5:1-8. Review.
- Baqui et al., 1999. Baqui AA, Meiller TF, Falkler WA Jr. Enhanced secretory leukocyte protease inhibitor in human immunodeficiency virus 1-infected patients.

- Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6:808-11.
- Barnes, 1999. Barnes PJ. Novel approaches and targets for treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: S72-S79.
- Baue, 1994. Baue AE. Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome-where do we stand? *Shock.* 1994; 2:385-97.
- Bauer, 2004. Bauer M. Molecular mechanisms of microcirculatory failure. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004; 129:2594-6.
- Bauer et al., 2004. Bauer M, Paxian M, Kortgen A. Acute liver failure. Current aspects of diagnosis and therapy. *Anaesthesist.* 2004; 53:511-30.
- Benjamin et al., 2002. Benjamin CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun.* 2002; 70:3602-10.
- Bergmeyer et al., 1978. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem.* 1978; 24:58-73.
- Bernard et al., 2001. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 344:699-709.
- Bloch, 1955. Bloch EH. The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination. *Angiology.* 1955; 6:340-9.
- Bloch, 2001. Bloch EH. Pioneer in the microscopic study of and the microcirculation of living tissues and organs. *Anat Rec.* 2001; 265:3-4.
- Bohlinger et al., 1996. Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermuller S, Tiegs G, Wendel A. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol.* 1996; 149:1381-93.
- Bohm et al., 1992. Bohm B, Aigner T, Kinne R, Burkhardt H. The serine-protease inhibitor of cartilage matrix is not a chondrocytic gene product. *Eur J Biochem.* 1992; 207:773-9.
- Bohrer et al., 1997. Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest.*

1997; 100:972-85.

- Bone et al., 1992. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992; 101:1644-55.
- Bone et al., 1997. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997; 112:235-43. Review.
- Budelmann, 1969. Budelmann G. [Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis]. *Internist (Berl)*. 1969; 10:92-101.
- Calandra et al., 2005. Calandra T, Cohen J; International Sepsis Forum Definition of Infection in the ICU Consensus Conference. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2005; 33:1538-48.
- Canbay et al., 2003. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology*. 2003; 38:1188-98.
- Chadda & Annane, 2002. Chadda K, Annane D. The use of corticosteroids in severe sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Ann Med*. 2002; 34:582-9. Review.
- Chaisson et al., 2002. Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest*. 2002; 110:193-202.
- Chu et al., 1997. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:10057-62.
- Clemens et al., 1985. Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE. Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment. *Am J Physiol*. 1985; 248:H804-11.
- Das, 2000. Das UN. Critical advances in septicemia and septic shock. *Crit Care*. 2000; 4:290-6. Epub 2000. Review.
- Das, 2003. Das UN. Current advances in sepsis and septic shock with particular emphasis on the role of insulin. *Med Sci Monit*. 2003; 9:RA181-92. Review.
- Davies & Hagen, 1997. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg*. 1997; 84:920-35. Review.

- Deitch, 1998. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998; 9:1-11. Review.
- Dellinger et al., 2004. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32:858-73. Review.
- de Waal Malefyt et al., 1991. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991; 174:1209-20.
- Dhainaut et al., 2001. Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*. 2001; 29:S42-7. Review.
- Dini et al., 1995. Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Serafino L, Vidal-Vanaclocha F. Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci*. 1995; 108:967-73.
- Dijkstra et al., 2002. Dijkstra G, Moshage H, Jansen PL. Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol Suppl*. 2002; (236):37-41. Review.
- DiPiro, 1997. DiPiro JT. Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis. *Pharmacotherapy*. 1997; 17:205-23. Review.
- Eguchi et al., 1991. Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS. Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology*. 1991; 13:751-7.
- Eichhorn et al., 2002. Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res*. 2002; 39:330-9.
- Eipel et al., 2004. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286:G769-76. Epub 2004.
- Eipel et al., 2005. Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg*. 2005; 241:477-84.
- Eisenberg et al., 1990. Eisenberg SP, Hale KK, Heimdal P, Thompson RC. Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Biol.*

Chem. 1990; 265:7976-7981.

- Emmanuilidis et al., 2001. Emmanuilidis K, Weighardt H, Maier S, Gerauer K, Fleischmann T, Zheng XX, Hancock WW, Holzmann B, Heidecke CD. Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J Immunol.* 2001; 167:3919-27.
- Eriksson et al., 2001. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J.* 2001; 15:1149-57.
- Escames et al., 2006. Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol.* 2006; 41:1165-73.
- Esmon, 2004. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004; 32:S219-22.
- Fan et al., 2005. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005; 37:719-27.
- Fink & Heard, 1990. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990; 49:186-96. Review.
- Franken et al., 1989. Franken C, Meijer CJ, Dijkman JH. Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J Histochem Cytochem.* 1989; 37:493-498.
- Freise et al., 2001. Freise H, Bruckner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. *J Invest Surg.* 2001; 14:195-212. Review.
- Freudenberg & Galanos, 1991. Freudenberg MA, Galanos C. Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infect Immun.* 1991; 59:2110-5.
- Gadjeva et al., 2004. Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, Wang YY, Dull K, Rogers AB, Erdman SE, Fox JG, Carroll M, Horwitz BH. A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol.* 2004; 173:5786-93.
- Galanos et al., 1979. Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76:5939-43.
- Garver et al., 1994. Garver RI Jr, Goldsmith KT, Rodu B, Hu PC, Sorscher EJ, Curiel DT. Strategy for achieving selective killing of carcinomas. *Gene Ther.* 1994; 1:46-50.

- Ghosh et al., 1998. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and REL Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:225-60. Review.
- Gipson et al., 1999. Gipson TS, Bless NM, Shanley TP, Crouch LD, Bleavins MR, Younkin EM, Sarma V, Gibbs DF, Tefera W, McConnell PC, Mueller WT, Johnson KJ, Ward PA. Regulatory effects of endogenous protease inhibitors in acute lung inflammatory injury. *J Immunol.* 1999; 162:3653-62.
- Gjertsson et al., 2001. Gjertsson I, Hultgren OH, Collins LV, Pettersson S, Tarkowski A. Impact of transcription factors AP-1 and NF-kappaB on the outcome of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis and sepsis. *Microbes Infect.* 2001; 3:527-34.
- Glanemann et al., 2003. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol.* 2003; 38:59-66.
- Grimminger et al., 1997. Grimminger F, Mayer K, Seeger W. Gibt es eine gesicherte Immuntherapie bei der Sepsis? *Der Internist.* 1997; 38:541-552.
- Gringhuis et al., 2007. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 2007; 26:605-16. Epub 2007.
- Grutter et al., 1988. Grutter MG, Fendrich G, Huber R, Bode W. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. *EMBO J.* 1988; 7:345-51.
- Habazettl et al., 1994. Habazettl H, Vollmar B, Christ M, Baier H, Conzen PF, Peter K. Heterogeneous microvascular coronary vasodilation by adenosine and nitroglycerin in dogs. *J Appl Physiol.* 1994; 76:1951-60.
- Hamilton et al., 2002. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by anti-inflammatory cytokines. *Immunol Res.* 2002; 25:229-45. Review.
- He et al., 2007. He M, Horuk R, Moochhala SM, Bhatia M. Treatment with BX471, a CC chemokine receptor 1 antagonist, attenuates systemic inflammatory response during sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292:G1173-80.
- Heinzel-Wieland et al., 1991. Heinzel-Wieland R, Steffens GJ, Flohe L. Inhibitory characteristics and oxidant resistance of site specific variants of recombinant human antileukoproteinase (ALP). *Biomed Biochim Acta.* 1991; 50:677-81.
- Herold, 2005. Herold G. Innere Medizin. *Gerd Herold Köln.* 2005; 270.

- Hochstrasser et al., 1972. Hochstrasser K, Reichert R, Schwarz S, Werle E. [Isolation and characterisation of a protease inhibitor from human bronchial secretion]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1972; 353:221-6.
- Hoffmann et al., 2004. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Fertmann J, Schildberg FW, Menger MD. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med.* 2004; 32:1011-7.
- Holmes et al., 2003. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest.* 2003; 124:1103-15.
- Hong et al., 1998. Hong KW, Kim KE, Rhim BY, Lee WS, Kim CD. Effect of rebamipide on liver damage and increased tumor necrosis factor in a rat model of endotoxin shock. *Dig Dis Sci.* 1998; 43:154S-159S.
- Horner et al., 2004. Horner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Role of the innate immune response in sepsis. *Anaesthesist.* 2004; 53:10-28. Review.
- Hotchkiss et al., 1999. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:14541-6.
- Hotchkiss et al., 2005. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Karl IE. Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? *Clin Infect Dis.* 2005; 41:S465-9. Review.
- Howard et al., 1993. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med.* 1993; 177:1205-8.
- Jaeschke & Smith, 1997. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol.* 1997; 61:647-53. Review.
- Jaeschke & Smith, 1997. Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol.* 1997; 273:G1169-73. Review.
- Jaeschke et al., 1998. Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol.* 1998; 160:3480-6.
- Jain et al., 2004. Jain S, Xu H, Duncan H, Jones JW Jr, Zhang JX, Clemens MG, Lee CY. Ex-vivo study of flow dynamics and endothelial cell structure during extended hypothermic machine perfusion preservation of livers. *Cryobiology.* 2004; 48:322-32.

- Jin & El-Deiry, 2005. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4:139-63. Epub 2005.
- Jochum et al., 1994. Jochum M, Gippner-Steppert C, Machleidt W, Fritz H. The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150:S123-30.
- Kamiike et al., 1989. Kamiike W, Fujikawa M, Koseki M, Sumimura J, Miyata M, Kawashima Y, Wada H, Tagawa K. Different patterns of leakage of cytosolic and mitochondrial enzymes. *Clin Chim Acta.* 1989; 185:265-70.
- Karin & Ben-Neriah, 2000. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:621-63.
- Khandoga et al., 2003. Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F. Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc Res.* 2003; 65:71-7.
- Kida et al., 1992. Kida K, Mizuuchi T, Takeyama K, Hiratsuka T, Jinno S, Hosoda K, Imaizumi A, Suzuki Y. Serum secretory leukoprotease inhibitor levels to diagnose pneumonia in the elderly. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146:1426-9.
- Kirschning & Bauer, 2001. Kirschning CJ, Bauer S. Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *Int J Med Microbiol.* 2001; 291:251-60.
- Klenke et al., 2005. Klenke FM, Merkle T, Fellenberg J, Abdollahi A, Huber PE, Gebhard MM, Ewerbeck V, Sckell A. A novel model for the investigation of orthotopically growing primary and secondary bone tumours using intravital microscopy. *Lab Anim.* 2005; 39:377-83.
- Klintman et al., 2004. Klintman D, Li X, Sato T, Wang Y, Jeppsson B, Thorlacius H. Staphylococcal enterotoxin A-induced hepatotoxicity is predominantly mediated by Fas ligand (CD95L). *Ann Surg.* 2004; 240:1065-72.
- Knudson et al., 2003. Knudson MM, Lee S, Erickson V, Morabito D, Derugin N, Manley GT. Tissue oxygen monitoring during hemorrhagic shock and resuscitation: a comparison of lactated Ringer's solution, hypertonic saline dextran, and HBOC-201. *J Trauma.* 2003; 54:242-52.
- Koike, 2004. Koike K. Animal models for sepsis. *Nippon Rinsho.* 2004; 62:2262-6.
- Kollmar et al., 2007. Kollmar O, Junker B, Rupertus K, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK. Liver Resection-Associated Macrophage Inflammatory Protein-2 Stimulates Engraftment but not Growth of Colorectal Metastasis at Extrahepatic Sites. *J Surg Res.* 2007; [Epub ahead of print]

- Kunkel & Ley, 1996. Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res.* 1996; 79:1196-204.
- Laschke et al., 2007. Laschke MW, Menger MD, Wang Y, Lindell G, Jeppsson B, Thorlacius H. Sepsis-associated cholestasis is critically dependent on P-selectin-dependent leukocyte recruitment in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292:G1396-402.
- Langer et al., 2005. Langer S, Goertz O, Steinstraesser L, Kuhnen C, Steinau HU, Homann HH. New model for in vivo investigation after microvascular breakdown in burns: use of intravital fluorescent microscopy. *Burns.* 2005; 31:168-74.
- Lavon et al., 2000. Lavon I, Goldberg I, Amit S, Landsman L, Jung S, Tsuberi BZ, Barshack I, Kopolovic J, Galun E, Bujard H, Ben-Neriah Y. High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat Med.* 2000; 6:573-7.
- Lawrence et al., 2001. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med.* 2001; 7:1291-7.
- Lawson et al., 1998. Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H. Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury. *Hepatology.* 1998; 28:865-867.
- Le Minh et al., 2007. Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol.* 2007; 170:1954-63.
- Lehmann et al., 2006. Lehmann C, Meissner K, Knock A, Diedrich S, Pavlovic D, Grundling M, Usichenko T, Wendt M, Birnbaum J. Activated protein C improves intestinal microcirculation in experimental endotoxaemia in the rat. *Crit Care.* 2006; 10:R157.
- Leist et al., 1995. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol.* 1995; 146:1220-34.
- Lindenblatt et al., 2006. Lindenblatt N, Braun B, Menger MD, Klar E, Vollmar B. C-peptide exerts antithrombotic effects that are repressed by insulin in normal and diabetic mice. *Diabetologia.* 2006; 49:792-800. Epub 2006.
- Livingston & Deitch, 1995. Livingston DH, Deitch EA. Multiple organ failure: a common problem in surgical intensive care unit patients. *Ann. Med.* 1995; 27:13-20.

- Maier et al., 2004. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*. 2004; 21:505-11.
- Manley et al., 2005. Manley MO, O'Riordan MA, Levine AD, Latifi SQ. Interleukin 10 extends the effectiveness of standard therapy during late sepsis with serum interleukin 6 levels predicting outcome. *Shock*. 2005; 23:521-6.
- Marchant et al., 1994. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*. 1994; 343:707-8.
- Marshall et al., 2005. Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, Opal S, Redl H, van der Poll T. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock*. 2005; 24:1-6.
- Martin et al., 2006. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006; 34:15-21.
- Maruyama et al., 1994. Maruyama M, Hay JG, Yoshimura K, Chu CS, Crystal RG. Modulation of secretory leukoprotease inhibitor gene expression in human bronchial epithelial cells by phorbol ester. *J Clin Invest*. 1994; 94:368-75.
- Masaki et al., 2005. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Noguchi H, Kakuma T, Endo M, Seike M, Watanabe T, Yoshimatsu H. The role of histamine H1 receptor and H2 receptor in LPS-induced liver injury. *FASEB J*. 2005; 19:1245-52.
- Maslinska, 2003. Maslinska D. Apoptosis: physiological cell death and its role in pathogenesis of diseases. *Neurol Neurochir Pol*. 2003; 37:315-26.
- McCuskey, 1966. McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat*. 1966; 119:3455-478.
- Meisner et al., 1998. Meisner M, Tschakowsky K, Hutzler A, Schick C, Schuttler J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med*. 1998; 24:680-4.
- Menger et al., 1991. Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res*. 1991; 23:158-69.
- Menger et al., 1999. Menger MD, Richter S, Yamauchi JI, Vollmar B. Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Ann Acad Med Singapore*. 1999; 28:542-56.
- Mignon et al., 1999. Mignon A, Rouquet N, Fabre M, Martin S, Pages JC, Dhainaut JF, Kahn A, Briand P, Joulin V. LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis, not for septic shock. *Am*

J Respir Crit Care Med. 1999; 159:1308-15.

- Mitzner et al., 2001. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Peszynski P, Schmidt R, Noldge-Schomburg G. Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:S75-82. Review.
- Mitzner et al., 2002. Mitzner SR, Stange J, Peszynski P, Klammt S. Extracorporeal support of the failing liver. *Curr Opin Crit Care.* 2002; 8:171-7. Review.
- Moraes et al., 2006. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13:21-7. Review.
- Mori & Prager, 1997. Mori N, Prager D. Activation of the interleukin-10 gene in the human T lymphoma line HuT 78: identification and characterization of NF-kappa B binding sites in the regulatory region of the interleukin-10 gene. *Eur J Haematol.* 1997; 59:162-70.
- Morikawa et al., 1996. Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K, Tamada Y, Yokochi T. Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun.* 1996; 64:734-8.
- Müller et al., 2000. Müller B, Becker KL, Schächinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, Ritz R. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med.* 2000; 28:977-83.
- Muller-Werdan, 2003. Muller-Werdan U. Septic shock and systemic inflammatory response syndrome--diagnosis. *Dtsch Med Wochenschr.* 2003; 128:2368-71.
- Nakamura et al., 2003. Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T, Igarashi T, Ebina M, Abe T, Miyazaki J, Takai T, Nukiwa T. Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J Exp Med.* 2003; 197:669-74.
- Nakata et al., 2002. Nakata M, Nakamura K, Koda Y, Kaminou T, Ugami M, Kaneda K, Yamada R. Hemodynamics in the microvasculature of thioacetamide-induced cirrhotic rat livers. *Hepatogastroenterology.* 2002; 49:652-6.
- Nishimura et al., 1986. Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y. Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. *Hepatology.* 1986; 6:701-7.
- Nitescu et al., 2007. Nitescu N, Grimberg E, Ricksten SE, Marcussen N, Nordlinder H, Guron G. Effects of thrombin inhibition with melagatran on renal hemodynamics and function and liver integrity during early endotoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292:R1117-24.

- Novotny et al., 2007a. Novotny AR, Emmanuel K, Maier S, Westerholt A, Weighardt H, Stadler J, Bartels H, Schwaiger M, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD. Cytochrome P450 activity mirrors nitric oxide levels in postoperative sepsis: predictive indicators of lethal outcome. *Surgery*. 2007; 141:376-84.
- Novotny et al., 2007b. Novotny A, Emmanuel K, Matevossian E, Kriner M, Ulm K, Bartels H, Holzmann B, Weighardt H, Siewert JR. Use of procalcitonin for early prediction of lethal outcome of postoperative sepsis. *Am J Surg*. 2007; 194:35-9.
- Nowak et al., 2000. Nowak M, Gaines GC, Rosenberg J, Minter R, Bahjat FR, Rectenwald J, MacKay SL, Edwards CK 3rd, Moldawer LL. LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278:R1202-9.
- Nystrom et al., 1999. Nystrom M, Bergenfeldt M, Ljungcrantz I, Lindeheim A, Ohlsson K. Production of secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) in human pancreatic beta-cells. *Mediators Inflamm*. 1999; 8:147-51.
- Oberholzer et al., 2002. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med*. 2002; 30:S58-S63.
- Ohlsson et al., 1984. Ohlsson M, Fryksmark U, Polling A, Tegner H, Ohlsson K. Localization of antileukoprotease in the parotid and the submandibular salivary glands. *Acta Otolaryngol*. 1984; 98:147-151.
- Ohlsson et al., 1995. Ohlsson K, Bjartell A, Lilja H. Secretory leucocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization. *J Androl*. 1995; 16:64-74.
- Opal & Glück, 2003. Opal SM, Glück T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med*. 2003; 31:S57-64.
- Otero-Antón et al., 2001. Otero-Antón E, González-Quintela A, López-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Pérez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res*. 2001; 33:77-9.
- Perl et al., 1995. Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA*. 1995; 274:338-45.
- Preissler et al., 2006. Preissler G, Massberg S, Waldner H, Messmer K. Intermittent capillary perfusion in rat pancreas grafts following short- and long-term preservation in University of Wisconsin solution. *Transpl Int*. 2006; 19:325-32.
- Pugin et al., 1993. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:2744-8.
- Pugin, 2007. Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp.* 2007; 280:21-7.
- Randow et al., 1995. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 1995; 181:1887-92.
- Rappaport, 1977. Rappaport AM. Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat.* 1977; (16 Pt 2):116-20.
- Reingardiene, 2004. Reingardiene D. [Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection]. *Medicina (Kaunas).* 2004; 40:696-701.
- Reinhart et al., 2006. Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, Gerlach H, Grundling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Werdan K. Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine. *Anaesthesist.* 2006; 55:43-56.
- Remick & Ward, 2005. Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock.* 2005; 24:7-11.
- Ren, 2002. Ren CL. Use of modulators of airways inflammation in patients with CF. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2002; 23:29-39. Review.
- Renné et al., 2006. Renné T, Nieswandt B, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36:148-51.
- Riordan & Williams, 2000. Riordan SM, Williams R. Acute liver failure: targeted artificial and hepatocyte-based support of liver regeneration and reversal of multiorgan failure. *J Hepatol.* 2000; 32:63-76.
- Rittirsch et al., 2007. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007; 81:137-43. Epub 2006.
- Rittler et al., 2004. Rittler P, Ketscher C, Inthorn D, Jauch KW, Hartl WH. Use of the molecular adsorbent recycling system in the treatment of postoperative hepatic failure and septic multiple organ dysfunction--preliminary results. *Liver Int.* 2004; 24:136-41.
- Rozga, 2006. Rozga J. Liver support technology--an update. *Xenotransplantation.* 2006; 13:380-9.

- Rücker et al., 2005. Rücker M, Binger T, Deltcheva K, Menger MD. Reduction of midfacial periosteal perfusion failure by subperiosteal versus suprapariosteal dissection. *J Oral Maxillofacial Surg.* 2005; 63:87-92.
- Sanfilippo & Blaho, 2003. Sanfilippo CM, Blaho JA. The facts of death. *Int Rev Immunol.* 2003; 22:327-40.
- Sanlioglu et al., 2001. Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB Jr, Ritchie TC, Hunninghake GW, Zandi E, Engelhardt JF. Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 2001; 276:30188-98. Epub 2001.
- Santoro et al., 2007. Santoro A, Mancini E, Ferramosca E, Faenza S. Liver support systems. *Contrib Nephrol.* 2007; 156:396-404.
- Scalia et al., 2007. Scalia R, Gong Y, Berzins B, Zhao LJ, Sharma K. Hyperglycemia is a major determinant of albumin permeability in diabetic microcirculation: the role of mu-calpain. *Diabetes.* 2007; 56:1842-9. Epub 2007.
- Schattenberg et al., 2006. Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Acute liver failure--medical viewpoints. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 2006; 95:1873-7.
- Schoen et al., 2007. Schoen M, Rotter R, Gierer P, Gradl G, Strauss U, Jonas L, Mittlmeier T, Vollmar B. Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J Trauma.* 2007; 63:788-97.
- Schottelius et al., 1999. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem.* 1999; 274:31868-74.
- Sehnert et al., 2004. Sehnert B, Cavcic A, Bohm B, Kalden JR, Nandakumar KS, Holmdahl R, Burkhardt H. Antileukoproteinase: modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:2347-59.
- Sehnert et al., 2006. Sehnert B, Gierer P, Ibrahim S, Kuhl A, Voll R, Nandakumar KS, Holmdahl R, Hallmann R, Vollmar B, Burkhardt H. Modulation of granulocyte-endothelium interactions by antileukoproteinase: inhibition of anti-type II collagen antibody-induced leukocyte attachment to the synovial endothelium. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8:R95.
- Sha et al., 1995. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell.* 1995; 80:321-30.
- Sharif et al., 2007. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC*

Immunol. 2007; 8:1

- Sherman & Fisher, 1986. Sherman IA, Fisher MM. Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy. *Hepatology*. 1986; 6:444-9.
- Siegel-Axel et al., 2006 Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M. [Role of platelets in atherosclerosis and inflammation]. *Med Klin (Munich)*. 2006; 101:467-75.
- Sorg et al., 2007 Sorg H, Hoffmann JN, Rumbaut RE, Menger MD, Lindenblatt N, Vollmar B. Efficacy of antithrombin in the prevention of microvascular thrombosis during endotoxemia: An intravital microscopic study. *Thromb Res*. 2007; 121:241-8.
- Sponer et al., 1991. Sponer M, Nick HP, Schnebli HP. Different susceptibility of elastase inhibitors to inactivation by proteinases from *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1991; 372:963-70.
- Strasser et al., 2000. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69:217-45. Review.
- Taggart et al., 2002. Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S. Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *J Biol Chem*. 2002; 277:33648-53. Epub 2002.
- Taggart et al., 2005. Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, Low TB, O'Neill SJ, McElvaney NG. Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med*. 2005; 202:1659-68. Epub 2005.
- Tak & Firestein, 2001. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001; 107:7-11.
- Takada et al., 2004. Takada Y, Singh S, Aggarwal BB. Identification of a p65 peptide that selectively inhibits NF-kappa B activation induced by various inflammatory stimuli and its role in down-regulation of NF-kappaB-mediated gene expression and up-regulation of apoptosis. *J Biol Chem*. 2004; 279:15096-104. Epub 2004.
- Tapalaga et al., 2002. Tapalaga D, Tiegs G, Angermuller S. NFkappaB and caspase-3 activity in apoptotic hepatocytes of galactosamine-sensitized mice treated with TNFalpha. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50:1599-609.
- Tartaglia et al., 1993. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993; 74:845-53.
- Thomas et al., 1998. Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*.

- 1998; 13:2216-26.
- Thompson & Ohlsson, 1986. Thompson RC, Ohlsson K. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986; 83:6692-6696.
- Thorlacius et al., 2006. Thorlacius K, Slotta JE, Laschke MW, Wang Y, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment, and hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *J Leukoc Biol.* 2006; 79:923-31.
- Tkalcevic et al., 2000. Tkalcevic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity.* 2000; 12:201-10.
- Ulevitch & Tobias, 1995. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13:437-57.
- Vogelmeier et al., 1996. Vogelmeier C, Gillissen A, Buhl R. Use of secretory leukoprotease inhibitor to augment lung antineutrophil elastase activity. *Chest.* 1996; 110:261S-266S.
- Volk et al., 1996. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Muller JM, Docke WD, Kox WJ. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.* 1996; 22:S474-81.
- Vollmar et al., 1992. Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg.* 1992; 75:421-30.
- Vollmar et al., 1993. Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K. Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function. *Zentralbl Chir.* 1993; 118:218-25.
- Vollmar et al., 1994. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994; 145:1421-31.
- Vollmar et al., 1996. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol.* 1996; 270:G798-803.
- Vollmar et al., 1997a. Vollmar B, Messner S, Wanner GA, Hartung T, Menger MD. Immunomodulatory action of G-CSF in a rat model of endotoxin-induced liver injury: an intravital microscopic analysis of Kupffer cell and leukocyte response. *J Leukoc Biol.* 1997; 62:710-8.
- Vollmar et al., 1997b. Vollmar B, Wolf B, Siegmund S, Katsen AD, Menger MD. Lymph vessel expansion and function in the development of hepatic fibrosis and cirrhosis.

- Am J Pathol.* 1997; 151:169-75.
- Vollmar et al., 1998. Vollmar B, Menger MD. The use of intravital microscopy in surgical research. 26-years of experience analyzed by studies presented at the Surgical Forum of the Annual Congress of the German Society of Surgery. *Langenbecks Arch Surg.* 1998; 383:282-5.
- Wahl et al., 1997. Wahl SM, McNeely TB, Janoff EN, Shugars D, Worley P, Tucker C, Orenstein JM. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-I. *Oral Dis.* 1997; 3:S64-9. Review.
- Wallner & Fritz, 1974. Wallner O, Fritz H. Characterization of an acid-stable proteinase inhibitor in human cervical mucus. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1974; 355:709–715.
- Wang et al., 2001. Wang DN, Zhang WJ, Wu XF. The new antiendotoxin strategies. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2001; 17:241-5.
- Ward & Lentsch, 2002. Ward PA, Lentsch AB. Endogenous regulation of the acute inflammatory response. *Mol Cell Biochem.* 2002; 234-235:225-8. Review.
- Weber et al., 2004. Weber SU, Schewe JC, Putensen C, Stuber F, Schroder S. Apoptosis as a pathomechanism in sepsis. *Anaesthesist.* 2004; 53:59-65.
- Welbourn et al., 1991. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991; 78:651-5. Review.
- Westin et al., 1994. Westin U, Fryksmark U, Polling A, Ohlsson K. Localisation of secretory leucocyte proteinase inhibitor mRNA in nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.* 1994; 114:199-202.
- Wichterman et al., 1980. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29:189-201.
- Wiese et al., 1999. Wiese A, Brandenburg K, Ulmer AJ, Seydel U, Muller-Loennies S. The dual role of lipopolysaccharide as effector and target molecule. *Biol Chem.* 1999; 380:767-84.
- Wilmer et al., 2002. Wilmer A, Nevens F, Evenepoel P, Hermans G, Fevery J. The Molecular Adsorbent Recirculating System in patients with severe liver failure: clinical results at the K.U. Leuven. *Liver.* 2002; 22:52-5.
- Wu, 2006. Wu CC. Possible therapies of septic shock: based on animal studies and clinical trials. *Curr Pharm Des.* 2006; 12:3535-41.
- Yang et al., 2005. Yang J, Zhu J, Sun D, Ding A. Suppression of macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide (LPS) by secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is independent of its anti-protease function. *Biochim Biophys Acta.*

2005; 1745:310-7.

- Yukioka et al., 2001. Yukioka H, Yoshida G, Kurita S, Kato N. Plasma procalcitonin in sepsis and organ failure. *Ann Acad Med Singapore*. 2001; 30:528-31.
- Zantl et al., 1998. Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun*. 1998; 66:2300-9.
- Zhang et al., 2007. Zhang H, Zhi L, Mochhala SM, Moore PK, Bhatia M. Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007.
- Zhang et al., 1997. Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E₂, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest*. 1997; 99:894-900.
- Zingarelli et al., 2003. Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*. 2003; 31:S105-11.

8. DANKSAGUNG

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation entstanden am Institut für Experimentelle Chirurgie. Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie an der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen, die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die Unterstützung bei der Literaturrecherche. Auch für ihre Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit bedanke ich mich herzlich. Ihre außerordentlichen Kenntnisse und ihr profundes Fachwissen waren eine entscheidende Voraussetzung für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Dissertation. Auch dafür, dass sie mir die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen gab, bedanke ich mich sehr.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Professor Michael D. Menger, dem Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes für sein Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Professor Harald Burkhardt danke ich herzlich für die Bereitstellung von ALP.

Großer Dank gilt Dr. Christian Eipel für seine wertvolle intensive fachliche und menschliche Betreuung, für die Zeit, die er sich stets genommen hat, seine Geduld bei allen Fragen und Problemen, und dafür, dass er mich in jeder Hinsicht unterstützte, indem er mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Durch konstruktive Kritik und zahlreiche fachliche Anregungen bis in die Endphase hinein hat er die Gestaltung dieser Arbeit wesentlich mit beeinflusst.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Franz und Maren Nerowski sowohl für ihre stetige gutgelaunte Hilfsbereitschaft und wertvolle technische Assistenz in allen Belangen des Laboralltags, als auch für ihre informativen Anregungen, die mir immer sehr geholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Frau Kerstin Abshagen, Herrn Dr. Hartmut Stein und Frau Anja Gellert für ihre stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, auch den hier nicht namentlich genannten, bin ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima am Institut sehr dankbar.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, für ihre Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben und mich auch bei der Erstellung der Dissertation vor allem moralisch unterstützten und somit zum Gelingen beigetragen haben.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Therapeutisches Potential von Antileukoproteinase in einem Modell des akuten septischen Leberversagens“ selbstständig angefertigt habe und mir darüber hinaus keine weitere Hilfe zuteil geworden ist.

Ich versichere, dass ich bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Rostock, 25.03.2008

Evelyn Kidess

THESEN ZUR DISSERTATION

Therapeutisches Potential von Antileukoproteinase in einem Modell des akuten septischen Leberversagens

1. Trotz intensiver klinischer und experimenteller Anstrengungen die der Sepsis zugrunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln, ist die Mortalität septischer Patienten unverändert hoch.
2. Die Leber gehört zu den entscheidenden Organen der Abwehrreaktion bei Sepsis. Daher ist das Leberversagen bei Patienten mit Sepsis und Multiorganversagen wegen dem damit einhergehenden Verlust der Synthese-, Exkretions- und Entgiftungsfunktion von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf und die Prognose der Patienten.
3. Für das akute septische Leberversagen sind bisher keine kausalen Therapieverfahren etabliert. Daher ist es wichtig, weitere Versuche zu unternehmen, um die Entwicklung sowohl kausaler als auch adjuvanter Therapiemöglichkeiten für das akute Leberversagen voranzutreiben.
4. Zur Induktion eines akuten Leberschadens wurde in diesem Forschungsvorhaben den Versuchstieren eine Kombination aus Lipopolysaccharid (LPS) und D-Galactosamin (D-GalN) injiziert. D-GalN wird ausschließlich in der Leber metabolisiert und führt zu einer deutlichen Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber LPS, indem es dort zu einer selektiven Depletion von Uridinnukleotiden mit nachfolgender schwerer Transkriptions- und Translationshemmung führt. Daher ist dieses Modell ideal zur isolierten Untersuchung der Vorgänge in der Leber beim septischen Organversagen.
5. Antileukoproteinase (ALP) ist ein säurestabiles, zysteinreiches Protein. Es ist ein physiologischer Inhibitor leukozytärer Serinproteasen und spielt eine wichtige Rolle im Schutz des Gewebes vor der Wirkung dieser Proteasen. Zusätzlich besitzt ALP antiinflammatorische Wirkungen auf Makrophagen und Neutrophile.

6. Die vorliegende in vivo Studie hatte zum Ziel, eine mögliche therapeutische Wirkung von ALP in einem murinen Modell des akuten Leberversagens zu evaluieren. Ziel war es dabei zu klären, ob ALP zu einer Hemmung des septischen Gewebeschadens im Hinblick Inflammation und Apoptose und somit zu einer Reduktion der Mortalität führt.
7. Mit Hilfe der etablierten Methode der Intravitalmikroskopie wurde die sinusoidale Perfusion und das Leukozytenfließverhalten in Sinusoiden und Venolen untersucht. Weiterhin wurden nach Entnahme von Blut- und Gewebeproben histologische, immunhistochemische, molekularbiologische und plasmaanalytische Untersuchungen durchgeführt. Zur Beurteilung der Mortalität wurden zusätzlich Überlebensversuche über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt.
8. Die Induktion eines akuten Leberversagens durch Injektion von D-GalN/LPS führte zu einer deutlichen Gewebsschädigung. Verglichen mit Kontrolltieren, die nur Kochsalzlösung erhielten, führte die Injektion von D-GalN/LPS zu einem massiven Perfusionsausfall, welcher durch ALP leicht verbessert wurde. Zusätzlich zeigte sich eine starke Erhöhung der hepatischen Leukozytenakkumulation, welche durch Applikation von ALP deutlich reduziert wurde.
9. Weiterhin führte die Applikation von ALP zu einer signifikanten Reduktion der Aktivitäten von ALT und AST im Serum, was darauf hinweist, dass ALP den nekrotischen Leberschaden deutlich einschränken konnte. Nichtsdestotrotz konnte in der Überlebensstudie, welche insgesamt 20 Tiere mit D-GalN/LPS-induziertem Leberschaden umfasste, die hohe Letalität (80%) durch zusätzliche Applikation von ALP (70%) nicht wesentlich beeinflusst werden.
10. Zur Beurteilung des apoptotischen Zelltodes wurde histochemisch die TUNEL-Analyse an Leberschnitten durchgeführt, welche zeigte, dass Injektion von D-GalN/LPS verglichen mit Kontrolltieren zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten sowie TUNEL-positiver nicht-parenchymatöser Zellen führte, welche durch Applikation von ALP nur leicht verringert wurde. In Ergänzung zur TUNEL-Analyse erfolgte die Western Blot Proteinanalyse der Cleaved Caspase-3.

Auch hier wurde die durch D-GalN/LPS-Injektion verursachte massive Erhöhung der Expression von Cleaved Caspase-3 Protein durch ALP nicht wesentlich reduziert.

11. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und seine Translokation in den Zellkern ist von entscheidender Bedeutung bei der Initiation der inflammatorischen Reaktion. NF κ B induziert die Produktion einer Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Mediatoren. Immunhistochemische Untersuchungen von NF κ B-p65 zeigten, dass die Anzahl NF κ B-p65-positiver Zellen, bei Induktion des akuten Leberschadens massiv erhöht und hauptsächlich im Nukleus lokalisiert war. Applikation von ALP führte zu einer signifikanten Reduktion NF κ B-p65-positiver Zellen. Gleichzeitig war die Immunpositivität vorwiegend auf das Zytoplasma der Hepatozyten begrenzt. Dies zeigt, dass ALP die Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B wesentlich reduzieren konnte.
12. Damit einhergehend waren nach Applikation von ALP auch die NF κ B-abhängigen Zytokine TNF- α und IL-10 signifikant supprimiert. Mit der Frage, ob die Herunterregulation von IL-10 eine Ursache der unverändert hohen Letalität der mit ALP vorbehandelten Tiere sein könnte, wurde in einer weiteren Überlebensstudie eine zusätzliche Gruppe evaluiert, in der die Versuchstiere neben D-GalN/LPS und ALP rekombinantes IL-10 exogen erhielten. Die Applikation von IL-10 führte zwar tendenziell zu einer Verlängerung der mittleren Überlebenszeit, konnte die Letalität jedoch nicht signifikant reduzieren.
13. Bei pathologischen Prozessen, bei denen die Apoptose als Form des hepatischen Zelltodes dominiert, scheint der Einsatz von ALP nicht adäquat zu sein. Die vorliegende Studie hat aber gezeigt, dass die Applikation von ALP durch Hemmung der nukleären Translokation von NF κ B effektiv gegen eine überschießende D-GalN/LPS-induzierte inflammatorische Antwort schützt. Daher könnte ALP zukünftig als adjuvantes antiinflammatorisches Therapeutikum beim akuten septischen Leberversagen von klinischem Interesse sein.