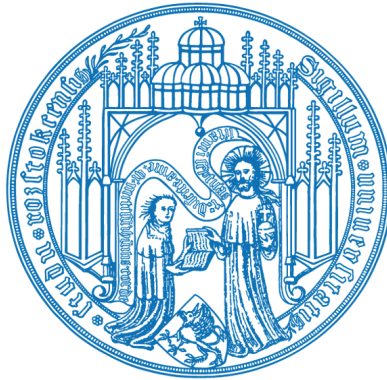


Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Die Mutation des mitochondrialen ATP8 Gens verbessert
den hepatischen Energiestatus im murinen Modell des
akuten septischen Leberversagens**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Anke Hildebrandt, geb. 06.09.1983 in Kühlungsborn

Rostock, 2009

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0091-5

Tag der Verteidigung: 26.05.2010

Gutachter:

Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung

Universität Rostock

Prof. Dr. med. Dipl. Chem. Jochen Schubert

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie

Universität Rostock

Apl. Prof. Dr. med. Johannes Hoffmann

Campus Großhadern

Chirurgische Klinik und Poliklinik

Ludwig-Maximilians-Universität München

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	7
ZUSAMMENFASSUNG	9
ABSTRACT	11
1 EINLEITUNG	12
1.1 Sepsis	12
1.1.1 Definition	12
1.1.2 Epidemiologie	14
1.1.3 Ätiologie	14
1.1.4 Genetische Polymorphismen	15
1.1.5 Pathophysiologie	16
1.1.5.1 Erkennung mikrobiologischer Strukturen	16
1.1.5.2 Das Netzwerk der Inflammation	17
1.1.5.3 Das septische Multiorganversagen	20
1.1.6 Therapie	21
1.1.6.1 Kausale Therapie	22
1.1.6.2 Supportive Therapie	22
1.1.6.3 Adjunktive Therapie	23
1.1.6.4 Zukünftige Therapieoptionen	24
1.2 Das akute Leberversagen	25
1.2.1 Definition	25
1.2.2 Ätiologie	26
1.2.3 Pathophysiologie	27
1.2.3.1 Apoptose, Nekrose und ihre Zwischenformen	27
1.2.3.2 Inflammationsreaktion und Mikrozirkulationsversagen	29
1.2.4 Therapie	29
1.2.4.1 Kausale Therapie	30
1.2.4.2 Allgemeine therapeutische Maßnahmen	31
1.2.4.3 Therapie von Komplikationen	32
1.2.4.4 Extrakorporale Leberersatzverfahren	33
1.2.4.5 Lebertransplantation	34

1.3	Rolle mitochondrialer Proteine beim septischen Leberversagen	35
1.3.1	Aufbau und Funktion der Atmungskette	36
1.3.2	Bedeutung für die Immunantwort	39
1.3.2.1	Oxidativer Stress	39
1.3.2.2	Autophagy, Apoptose und Nekrose	41
1.3.3	Das mitochondriale Gen ATP8	44
2	ZIEL DER ARBEIT	48
3	MATERIAL UND METHODEN	49
3.1	Versuchstiere	49
3.2	Modell	49
3.2.1	Modell zum Studium des akuten septischen Leberversagens	49
3.2.1.1	D-Galactosamin	50
3.2.1.2	Lipopolysaccharid	50
3.2.2	Anästhesie und chirurgische Präparation	50
3.3	Untersuchungstechniken	52
3.3.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	52
3.3.1.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	52
3.3.1.2	Fluoreszenzfarbstoffe	53
3.3.1.3	Konfiguration und Versuchsdurchführung	54
3.3.2	Mikrozirkulatorische Parameter	55
3.3.2.1	Hepatische sinusoidale Perfusion	55
3.3.2.2	Venulares Leukozyten-Rolling und venulare Leukozytenadhärenz	56
3.3.3	Entnahme von Blut- und Gewebeproben	57
3.3.4	Plasmaanalytik	57
3.3.4.1	Aktivität leberspezifischer Enzyme	57
3.3.4.2	Interleukin-6	58
3.3.4.3	Oxidativer Stress	58
3.3.5	Histologie und Immunhistochemie	58
3.3.5.1	Hämatoxylin-Eosin	58
3.3.5.2	Cleaved Caspase-3	58
3.3.5.3	Chloracetatesterase	59
3.3.6	Western Blot Analytik	60
3.3.7	Analyse des metabolischen Energiestatus	61

3.4	Überlebensstudie	62
3.5	Experimentelles Protokoll	62
3.6	Statistik	64
4	ERGEBNISSE	65
4.1	Inflammation	65
4.1.1	Hepatische Mikrozirkulation	65
4.1.1.1	Sinusoidales Perfusionsversagen	65
4.1.1.2	Intravasale Leukozytenretention	66
4.1.2	Hepatische parenchymale Leukozyteninfiltration	67
4.1.3	Plasmakonzentration von IL-6	68
4.2	Oxidativer Stress	68
4.3	Hepatischer metabolischer Energiestatus	69
4.4	Zelltod	71
4.4.1	Hepatozelluläre Integrität	71
4.4.1.1	Histopathologie	71
4.4.1.2	Plasmakonzentration leberspezifischer Enzyme	72
4.4.2	Hepatozelluläre Apoptose	73
4.4.2.1	Quantitativer Nachweis mittels Immunhistochemie	73
4.4.2.2	Spezifische Beurteilung mittels Western-Blot-Analysen	73
4.5	Überlebensstudie	74
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
5	DISKUSSION	78
5.1	Diskussion von Material und Methoden	78
5.1.1	Das Tiermodell des akuten septischen Leberversagens	78
5.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken	82
5.2	Diskussion der Ergebnisse	87
5.2.1	Das akute septische Leberversagen	87

5.2.2	Die Rolle des mitochondrialen Gens ATP8 beim akuten septischen Leberversagen.....	92
5.3	Schlussfolgerungen	99
5.4	Perspektiven	100
6	REFERENZEN	103
7	LEBENS LAUF	123
8	DANKSAGUNG	125
	THESEN ZUR DISSERTATION	127
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	129

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ALT	Alaninaminotransferase
ALV	akutes Leberversagen
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Analysis of Variance
ARDS	acute respiratory distress syndrome
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bax protein
Bcl	B-cell lymphoma
CAE	Cloroacetatesterase
CCD	charge-coupled device
CD	cluster of differentiation
CT	Computertomographie
D-GalN	D-Galactosamin
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GLDH	Glutamatdehydrogenase
h	Stunde(n)
HDL	high-density-lipoprotein
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HIV	human immunodeficiency virus
HMGB1	high mobility group B1 protein
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
INR	international normalized ratio
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
LBP	LPS-binding protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	low-density-lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MARS	molecular adsorbent recirculation system
MCP	monocyte chemoattractant protein
MDA	Malondialdehyd
MELS	modular extracorporeal liver support system
MIF	macrophage migration inhibitor factor
MIP	macrophage inflammatory protein
min	Minute(n)
mmHG	Millimeter Quecksilber
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
MPT	mitochondrial permeability transition
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PRR	pattern recognition receptor
rhAPC	rekombiniertes aktiviertes Protein C
ROS	reaktive Sauerstoffradikale (reactive oxygen species)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	standard error of the mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	tumor necrosis factor-α
UCP	uncoupling protein
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.Chr.	vor Christus

ZUSAMMENFASSUNG

Das akute Leberversagen stellt im Verlauf septischer Erkrankungen eine gefürchtete Komplikation dar. Die Pathophysiologie dieses Organversagens wird entscheidend dadurch geprägt, dass durch das Zusammenspiel freigesetzter Zytokine und gesteigerter Zell-Zell-Interaktionen ein vermehrter Zelltod zu beobachten ist. Eine wesentliche Rolle kommt hierbei dem gestörten zellulären Energiemetabolismus zu. Ziel der vorliegenden *in vivo*-Studie war es, den Einfluss einer Mutation des mitochondrialen Gens ATP8, welches für eine Untereinheit der ATP-Synthase kodiert, auf die Entwicklung des akuten septischen Leberversagens anhand eines etablierten Mausmodells zu evaluieren.

Zur Induktion des akuten septischen Leberversagens erhielten C57BL/6J Wildtypmäuse (B₆ ALV) sowie ATP8-Mutanten (B₆-FVB ALV) männlichen Geschlechts eine intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid (E.coli LPS, 10 µg/kg KG) und D-Galactosamin (D-GalN, 720 mg/kg KG). Tiere beider genetischer Hintergründe ohne Induktion eines akuten Leberversagens erhielten äquivalente Volumina physiologischer Kochsalzlösung und dienten als Kontrolle (B₆ Sham bzw. B₆-FVB Sham). Unter Ketamin/Xylazin-Narkose erfolgte fünfeinhalb Stunden nach der Vorbehandlung die *in vivo*-Fluoreszenzmikroskopie der Leber. Blut- und Lebergewebeproben dienten für histologische, immunhistochemische sowie molekularbiologische Untersuchungen. Daneben wurden Parameter des metabolischen Energiestatus erhoben. Darüberhinaus wurde die Überlebensrate der Tiere (n = 10 je Gruppe) nach Induktion des akuten Leberversagens erfasst.

Fünfeinhalb Stunden nach D-GalN/LPS-Applikation zeigten Tiere beider Gruppen charakteristische Merkmale des akuten Leberversagens. Die *in vivo*-Analyse der hepatischen Perfusionsparameter mittels Intravitalmikroskopie stellte ein Perfusionsversagen von rund 40 % der Sinusoide sowie einen starken Anstieg adhärenter Leukozyten dar. Die Plasmakonzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 erhöhte sich nach Induktion des akuten Leberversagens auf das 20fache im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Die D-GalN/LPS-Applikation führte zu einem starken Anstieg apoptotischer sowie nekrotischer Hepatozyten. Im akuten Leberversagen zeigte sich eine Zunahme Caspase-3 positiver, apoptotischer Zellen um mehr als das 100fache. Die Aktivitäten der Leberenzyme AST, ALT und GLDH, welche als Indikatoren für den nekrotischen Zellschaden herangezogen wurden, stiegen ebenfalls sig-

nifikant an. Die Mutation des Gens ATP8 hatte auf das Ausmaß der Entzündungsreaktion keinen erkennbaren Einfluss.

Von besonderer Bedeutung war die Genmutation dagegen bei der Analyse des hepatischen Energiemetabolismus. Hier konnte gezeigt werden, dass ATP8-mutierte Tiere innerhalb des akuten septischen Leberversagens einen höheren Gehalt an ATP in den Hepatozyten als Wildtypiere aufweisen (4,9 $\mu\text{mol/g}$ vs 2,7 $\mu\text{mol/g}$). Das ATP/ADP-Verhältnis, welches als Indikator für den metabolischen Energiestatus gilt, zeigte bei ATP8-Mutation einen signifikant höheren Wert (1,48 vs. 0,65). Die Aktivität der Adenylatkinasereaktion war nach Induktion des akuten Leberversagens in ATP8-Mutanten dramatisch erhöht (0,95 vs. 0,36), was für einen vermehrten Substratumsatz in der Atmungskette in dieser Situation spricht. Der verbesserte Energiestatus der ATP-mutierten Tiere könnte die zum Teil signifikant verminderte Freisetzung von leberspezifischen Enzymen erklären, welche ein Hinweis für eine geringer ausgeprägte Nekrose ist. Eine weitere Konsequenz stellt das bessere Überleben bei ATP8-Mutation dar. So lebten 48 Stunden nach D-GalN/LPS-Applikation noch 35 % der ATP8-Mutanten, jedoch nur noch 15 % der Wildtypiere. Die induzierte Inflammationsreaktion führte zur ansteigenden Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), wobei ATP8-Mutanten einen höheren Gehalt an Malondialdehyd, einem Lipidperoxidationsprodukt, im Vergleich zu den Wildtypieren aufwiesen (4,7 $\mu\text{mol/ml}$ vs. 2,9 $\mu\text{mol/ml}$). Die ATP8-Mutation stärkte den extrinsischen und drosselte den intrinsischen Aktivierungsweg der Apoptose, wobei die Gesamtrate an apoptotischen Hepatozyten im akuten septischen Leberversagens unverändert blieb.

Im hier dargestellten Modell des D-GalN/LPS-induzierten akuten Leberversagens zeigte die Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 und damit das Fehlen der Untereinheit A6L der ATP-Synthase einen deutlichen Einfluss auf den metabolischen Energiestatus der Hepatozyten. Zwar konnte kein Einfluss dieser Mutation auf die Ausprägung der Entzündungsreaktion oder auf das Ausmaß der Apoptose gezeigt werden, jedoch ergaben sich aus dem verbesserten Energiestatus der ATP8-mutierten Tiere innerhalb des akuten septischen Leberversagens ein verminderter Zellschaden sowie ein verbessertes Kurzzeitüberleben. Diese Ergebnisse unterstreichen den Stellenwert des genetischen Einflusses auf den Verlauf der Sepsis und bestätigen, dass ein ausgeglichener Energiehaushalt von entscheidender Bedeutung für das „outcome“ septischer Erkrankungen ist.

ABSTRACT

Mitochondria not only generate and modulate bioenergy but also serve as biosensors for oxidative stress, and eventually become effector organelles for cell viability. Therefore, the implications of mitochondrial (dys)function in the development of multiple organ failure are profound. We investigated whether a mutation in the ATPase subunit-8 gene exerts effects on the course of endotoxemic acute liver failure in mice. For this purpose, wildtype and ATP8 mutant mice were challenged with D-galactosamine (D-GalN) and Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS) and studied 6 hrs thereafter. Control mice received physiological saline only. Analysis included in vivo fluorescence microscopy of hepatic microcirculation and determination of hepatocellular apoptosis, levels of hepatic adenosine nucleotides as well as concentrations of plasma malondialdehyde as a marker of oxidative stress. Induction of endotoxemic liver failure provoked marked liver damage, characterized by microvascular perfusion failure, leukocyte recruitment, transaminase and cytokine release. Furthermore, liver injury was coexistent with a drop of total adenosine nucleotide level and an increased malondialdehyde production. Of interest, oxidative stress was significantly higher in the GalN/LPS challenged ATP8 mutants compared to wild types. In contrast, adenosine triphosphate (ATP) levels in livers of mice carrying the ATP8 mutation remained significantly higher than those in wild type mice. As a net result, ATP8 mutant mice showed lower transaminase release and better survival rate compared to wild types. Our findings demonstrate that mutation in the ATPase subunit 8 partially protects mice under endotoxemic stress conditions most probably due to better hepatic energy status despite elevated overall oxidative stress. Thus, modulating mitochondrial function to preserve bioenergetic status may be an effective way to protect against sepsis-induced multiorgan dysfunction.

1 EINLEITUNG

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition

Das Wort Sepsis kommt aus dem griechischen und bezeichnete ursprünglich den krankhaften Zerfall von Gewebe (Nathens und Marshall, 1996). Bereits 400 v.Chr. beschrieb *Hippocrates* eine Fäulniskrankheit, die 7 - 14 Tage nach einer Verwundung mit Fieber beginnt und häufig zum Tod führt. Bis zur Begründung der modernen Mikrobiologie durch *Pasteur* und *Koch* im 19. Jahrhundert war die Annahme von *Hippocrates* bestimmend, dass zirkulierende Fäulnisgifte Ursache für das Krankheitsgeschehen sind (Kreymann und Wolf, 1996).

Die erste moderne Sepsisdefinition stammt aus dem Jahr 1914 von dem deutschen Internisten *Hugo Schottmüller*: „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.“ (Budermann, 1969).

In den folgenden Jahrzehnten ermöglichte der technische Fortschritt eine immer umfassendere Erforschung der Ursachen und Auswirkungen der Sepsis auf den menschlichen Organismus. Diese neuen Erkenntnisse und Studien führten zu einem Definitionsproblem. Welche Kriterien müssen erfüllt sein, damit die Diagnose Sepsis gestellt werden kann?

Roger C. Bone vertrat die Meinung, dass eine vorhandene Infektion die Grundvoraussetzung für die Diagnose Sepsis ist (Bone et al., 1989). Da eine einheitliche Definition notwendig war, um Studien vergleichen zu können und damit einen Fortschritt in der Therapie zu ermöglichen, wurde von den führenden Mitgliedern des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) 1991 eine Konferenz abgehalten. Ziel dieser Veranstaltung war die Veröffentlichung einer einheitlichen Sepsisdefinition sowie von Richtlinien für die klinische Diagnosestellung (siehe Abb.1 und Tab.1; Bone et al., 1992). Die von Klinikern und Forschern 1992 veröffentlichten Definitionen waren wegweisend und finden bis heute Anwendung.

Ein **systemisches Inflammationssyndrom (SIRS)** liegt vor, wenn zwei der folgenden Kriterien erfüllt werden:

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), bestätigt durch eine rektale oder intravasale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($p_a\text{CO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa}$)
- Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Eine **Sepsis** liegt vor, wenn zu der Diagnose **SIRS** eine Infektion durch einen mikrobiologischen Nachweis gesichert oder durch klinische Kriterien angenommen werden kann.

Eine **schwere Sepsis** liegt vor, wenn es zur Hypoperfusion des Gewebes mit Organdysfunktion sowie den Folgen Laktatazidose, Oligurie und Störungen der geistigen Funktionen kommt.

Als **septischer Schock** wird der Zustand bezeichnet, bei dem trotz adäquater Volumenersatztherapie eine Hypotonie (systolischer Druck $< 90 \text{ mmHg}$ oder $> 40 \text{ mmHg}$ unter dem Normaldruck des Patienten) anhält oder es einen Bedarf an Vassopressoren gibt, um den systolischen Blutdruck $> 90 \text{ mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $> 65 \text{ mmHg}$ zu halten.

Beim **Multiorganversagen** kommt es zum Ausfall von mehr als einem Organ, sodass die Homöostase ohne Invention nicht aufrechterhalten werden kann.

Tab. 1: Definition der Sepsis (Bone et al., 1992; Bone et al., 1997)

Im Jahr 2001 wurde erneut eine Konferenz zur Sepsisdefinition einberufen, welche die Definitionen von 1992 bestätigte und dennoch einen Ausbau der Diagnosekriterien für SIRS für notwendig erachtete. Mit dem PIRO-Modell wurde ein Vorschlag für das „Staging“ der Sepsispatienten vorgestellt (Levy et al., 2003).

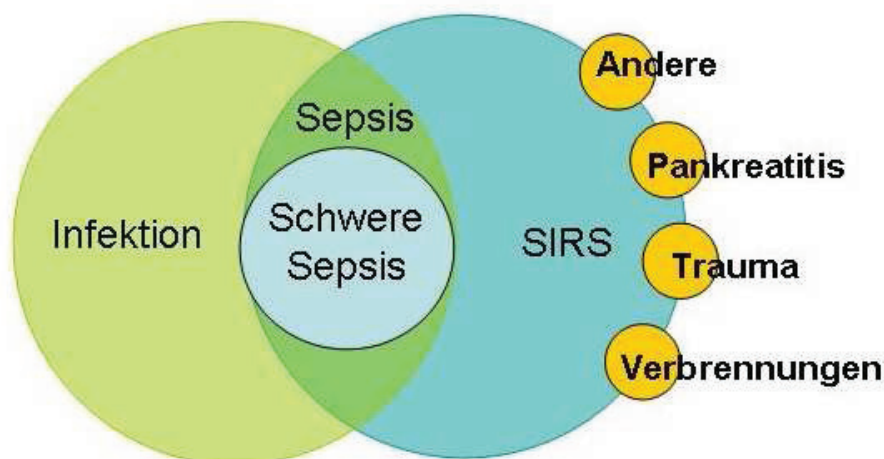


Abb. 1: Die Beziehungen zwischen Infektion, SIRS und Sepsis. Ursachen eines systemischen Inflammationssyndrom (SIRS) sind u.a. Verbrennungen, Traumata oder Pankreatitiden. Kommt es zusätzlich zum Nachweis einer Infektion, kann die Diagnose Sepsis gestellt werden. Eine schwere Sepsis definiert sich durch das Versagen mindestens eines Organs (modifiziert nach Bone et al., 1992).

1.1.2 Epidemiologie

In den USA erkranken jährlich etwa 750.000 Menschen an einer schweren Sepsis, die mit einer Letalität von 28,6 % eine der Haupttodesursachen auf Intensivstationen darstellt. Mit 215.000 Todesfällen pro Jahr liegen die Todeszahlen einer schweren Sepsis etwa genauso hoch wie beim akuten Myokardinfarkt (Angus et al., 2001).

In Deutschland erkranken pro Jahr 150.000 Einwohner neu an einer Sepsis. Mit 60.000 Todesfällen im Jahr stellen septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache in der Bundesrepublik dar (Reinhart et al., 2006).

Bei 11 % (van Gestel et al., 2004) bis 40 % (Vincent et al., 2006) aller Patienten von Intensivstationen kann die Diagnose Sepsis gestellt werden. Durch die lange Liegedauer und die kostenintensive Therapie wird die Behandlung von septischen Patienten zunehmend auch zu einer sozialökonomischen Belastung (Moerer und Burchardi, 2004). Mit 1,77 Milliarden Euro werden etwa 30 % des intensivmedizinischen Budgets für die Behandlung septischer Erkrankungen aufgewendet (Brunkhorst, 2006).

In den letzten Jahrzehnten hat die Inzidenz der Sepsis kontinuierlich zugenommen (Vincent et al., 2006). Lag die Zahl der Sepsisdiagnosen 1979 bei 83 pro 100.000 Einwohnern, stieg diese Zahl im Jahr 2000 bereits auf 240 Fälle (Martin et al., 2000). Der Anstieg der Fallzahlen ist zum Teil mit der zunehmenden Invasivität der therapeutischen Maßnahmen zu erklären. Die Weiterentwicklung der Intensivmedizin ermöglicht zudem die Therapie von immer älteren Menschen und anderen Hochrisikopatienten (Reinhart und Brunkhorst, 2002; Moerer und Burchardi 2004). Obwohl es in der Behandlung von septischen Erkrankungen in der Vergangenheit zu großen Fortschritten gekommen ist, konnte kein Absinken der Mortalität in den letzten 30 Jahren verzeichnet werden (Chaudry, 1999; Trampuz und Zimmerli, 2003).

1.1.3 Ätiologie

Nach einer deutschen Prävalenzstudie waren 68% aller Patienten mit einer schweren Sepsis älter als 60 Jahre. Neben einem fortgeschrittenen Alter ist auch eine schwerwiegende Komorbidität (z.B. Herzinsuffizienz im Stadium NYHA IV, dialysepflichtiges Nierenversa-

gen, metastasierende Tumorerkrankungen, Leberzirrhose, schwere restriktive oder obstruktive Lungenerkrankung oder AIDS) risikoerhöhend für eine Sepsiserkrankung (Brunkhost, 2006). Ein großes Risiko stellen septische Erkrankungen auch für Kleinkinder im ersten Lebensjahr dar. 1995 verstarben in den USA 4.400 Kinder an einer schweren Sepsis. Ihr Anteil an kindlichen Todesfällen war mit 7 % damit sogar höher als der von Krebserkrankungen (Moerer und Burchardi, 2004).

Den häufigsten Infektionsfokus der Sepsis stellen Atemwegsinfektionen (63 %) dar. Es folgen intraabdominelle (25 %) und urogenitale Infektionen (7 %). Gemäß dieser Studie wurden die Infektionen zu 35 % ambulant erworben (Brunkhorst, 2006).

1.1.4 Genetische Polymorphismen

Zwillingsstudien konnten einen großen Einfluss von genetischen Faktoren auf die Anfälligkeit des Organismus, an einer Infektion zu sterben, nachweisen (Sörensen et al., 1988). Genetische Polymorphismen können die Physiologie vor oder während des Inflammationsgeschehen derart beeinflussen, dass das Risiko, an einer Infektion zu erkranken, die Schwere der Erkrankung sowie die Wahrscheinlichkeit, an ihr zu versterben, zu einem großen Teil vom Erbgut prädispositioniert sind (Lin und Albertson, 2004). Polymorphismen einzelner Nukleotide, Mikrosatelliten, Insertionen oder Deletionen spiegeln das breite Spektrum der genetischen Variationen wider, die das individuelle Risikoprofil für die Sepsis charakterisieren (Cobb und O’Keefe, 2004). Ein bekannter Polymorphismus des TNF- α Gens führt im Organismus zu einer erhöhten Konzentration des Zytokins und einer gesteigerten Mortalität im septischen Schock (Appoloni et a., 2001). Ein zweites Beispiel sind genetische Varianten des „Toll Like Receptors“ (TLR), die die Anfälligkeit für septische Erkrankungen beeinflussen (Lorenz et al., 2000). Weitere Beispiele für genetische Varianten mit Einfluss auf septische Erkrankungen zeigt Tabelle 2.

Beeinflusster Faktor	Genetische Assoziation	Klinischer Effekt
TNF- α	TNF2 Allel G308A Mutation in der TNF Promoter-Region	Hohe Serumkonzentration von TNF- α assoziiert mit Nicht-Überleben der Sepsis
Lymphotoxin- α (TNF- β)	TNFB2 Allel	Gesteigerte Serumkonzentration an Lymphotoxin assoziiert mit einer Sepsis in Traumapatienten

Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra)	ILRN2 Allel	Gesteigerte Konzentrationen an IL-1 β und schwere Sepsis, gesteigerte Mortalität bei homozygoten Trägern
Faktor V	FV	Möglicherweise ein milder Effekt auf die Schwere einer Meningokokkeninfektion
Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1)	4/G5/G Insertion/Deletion	Gesteigerte Konzentrationen an PAI-1 und schwerere Meningokokkeninfektion
CD14	C(-159)T Promoter Polymorphismus	Erhöhte Anfälligkeit für septischen Schock und Tod
Toll Like Rezeptor 4 (TLR4)	Asp299Gly Allel	Assoziation mit septischem Schock, besonders bei gram-negativer Sepsis

Tab.2: Übersicht zu genetischen Polymorphismen und ihre Relevanz für die Sepsis und schwere Infektionen (modifiziert nach Cohen, 2002).

1.1.5 Pathophysiologie

„The Microorganisms that seems to have it in it for us...turn out...to be rather more like bystanders... It is our response to their presence that make the disease. Our arsenals for fighting off bacteria are so powerful...that we are more in danger from them than the invaders.“
 Thomas Lewis (Hotchkiss und Karl, 2003)

Thomas Lewis beschreibt in seiner Arbeit, dass die Pathophysiologie der Sepsis in einer unkontrollierten Immunantwort begründet ist. Die verantwortlichen Mechanismen und Vorgänge sind sehr komplex und beeinflussen sich gegenseitig in einem verzweigten Netzwerk. Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten ist die Pathophysiologie der septischen Erkrankungen noch nicht bis ins letzte Detail verstanden. In den folgenden Abschnitten sollen die beteiligten Vorgänge und ihre Interaktionen in einem Überblick vorgestellt werden.

1.1.5.1 Erkennung mikrobiologischer Strukturen

Die Aktivierung der Inflammationsreaktion im Organismus kann durch eine direkte Gewebeschädigung endogen erfolgen oder durch eine exogene mikrobiologische Invasion eingeleitet werden (Bone et al., 1997; Holmes et al., 2003). Mikrobiologische Strukturen, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden und eine Abwehrreaktion verursachen können, werden als „pathogen-associated molecular-patters“, PAMPs, bezeichnet. Zu diesem Komplex gehören Zellwandbestandteile von Bakterien und Pilzen (Peptidoglykan, Lipoteichonsäure,

Flagellin, Mannan) oder spezifische bakterielle DNA-Bestandteile (Trampuz und Zimmerli, 2003). Für die Pathogenese von gram-negativen Erregern spielt Lipopolysaccharid (LPS), auch Endotoxin genannt, die dominante Rolle (Cohen, 2002). Die folgenden Ausführungen werden sich auf dieses Pathogen beziehen. Gelangen PAMPs in den Organismus, werden sie von spezifischen Rezeptoren, den „pattern recognition receptors“ (PRR), erkannt und eine Immunreaktion wird ausgelöst. Nachdem LPS in den Organismus eingedrungen ist, wird es an das LPS-binding-protein (LBP) gekoppelt. Dieser Komplex bindet am Oberflächenrezeptor CD14, der aufgrund des Fehlens einer intrazellulären Domäne kein transmembranöses Signal in das Zellinnere weitergeben kann. Diese Aufgabe übernimmt der assoziierte TLR4 aus der Familie der Toll-like-Rezeptoren (Cohen, 2002; Holmes et al., 2003; Hörner et al., 2004). Durch Dimerisierung des Rezeptors wird eine intrazelluläre Signalkaskade gestartet, die zur Freisetzung von NFκB aus seinem inaktiven Komplex mit IκB im Zytoplasma führt und von der Translokation in den Zellkern gefolgt wird. Als Transkriptionsfaktor verstärkt NFκB die Expression von Genen, die sowohl für die pro- als auch für die antiinflammatorische Immunantwort von Bedeutung ist (Holmes et al., 2003).

1.1.5.2 *Das Netzwerk der Inflammation*

Bereits in den ersten 30 - 90 Minuten nach dem Eindringen von LPS in den Körper wird das angeborene Immunsystem aktiviert. Makrophagen und Monozyten sezernieren verschiedene **Mediatoren**, die wiederum weitere Signalkaskaden aktivieren (siehe Tab. 3; Cohen, 2002). Kann die Entzündungsreaktion nicht lokal begrenzt werden, kommt es zur Ausbildung des systemischen Inflammationssyndrom (SIRS). Im Verlauf der Abwehrreaktion ist sequenziell die Konzentration zuerst pro- und später antiinflammatorisch wirksamer Zytokine im Serum erhöht (Volk et al., 1996; Trampuz und Zimmerli, 2003). Die Regulation der Zytokinausschüttung ist sehr komplex und wird durch ein Netzwerk zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalkaskaden reguliert (Bone et al., 1997). Weiterhin kommt es früh zur Aktivierung des **Komplementsystems**, wobei der beteiligte Faktor C5a einen starken chemotaktischen Reiz für Granulozyten darstellt und die inflammatorischen Vorgänge zusätzlich verstärkt (Riedemann et al., 2003). Durch Makrophagen und Monozyten, die zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören, wird die erworbene Immunantwort mit aktivierten T- und B-Zelle einbezogen (Hörner et al., 2004).

Mediatoren	typische Effekte
IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , High mobility group B1 protein (HMGB1)	Aktivierung von Neutrophilen, Lymphozyten und Endothelzellen; Hochregulation von Adhäsionsmolekülen; Induktion von Prostaglandinen, NO-Synthase und des Akute-Phase-Proteins; Induktion von Fieber
IL-8, Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP 1 α) MIP 1 β , Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP 1); MCP-3	Mobilisierung und Aktivierung von inflammatorischen Zellen, vor allem von Neutrophilen; Aktivierung von Makrophagen
Platelet-activating factor (PAF), Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane, Tissue factor	Aktivierung der Endothelzellen, Regulation des Vasotonus, Aktivierung der Gerinnungskaskade
Superoxid, Hydroxylradikale, Stickstoffmonoxid (NO)	Antibakterielle Wirkung, Regulation des Vasotonus
IL-1 Rezeptor Antagonist IL-4, IL-10, IL-13 Transforming growth factor- β Löslicher TNF- α Rezeptor Bacterial/permeability-increasing protein	Antiinflammatorische Effekte

Tab. 3: Mediatoren des systemischen Inflammationssyndroms (modifiziert nach Cohen, 2002).

Werden **neutrophile Granulozyten** durch ein Inflammationsgeschehen aktiviert, sind sie in der Lage aus dem Blutstrom heraus in das betroffene Gewebe einzuwandern (Wagner und Roth, 1999). In der Frühphase kommt es zu einer lockeren Interaktion zwischen neutrophilen (L-Selektin) und endothelialen (P- und E-Selektin) Rezeptoren. Dieser Vorgang kann in postkapillaren Venolen als „Slow-Rolling-Phänomen“ beobachtet werden. Der Zell-Zellkontakt verstärkt die Präsentation von Adhäsionsrezeptoren aus der Gruppe der β_2 -Integrine (CD 11/CD18), die zu einer festen Anheftung der Leukozyten an die Endothelwand führt und die Emigration (Diapedese) in das umliegende Gewebe ermöglicht (Bauer, 2004; Hörner et al., 2004). Das Ziel des Einwanderns in das Gewebe ist die primäre Bakterienelimination durch Phagozytose. Mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und Proteasen kann es dabei zu einer starken Schädigung des Gewebes kommen (Wagner und Roth, 1999; Hörner). Für die Sepsis stellen die neutrophilen Granulozyten ein zweiseitiges Schwert dar (Hotchkiss und Karl, 2003). Sind sie in ihrer Aktivität eingeschränkt, so resultiert daraus eine dramatische Verstärkung der Infektion (Belaouaj et al., 1998). Eine Überaktivität mit

massiver Produktion von zytotoxischen Faktoren führt dagegen zu einer schweren Schädigung des Organismus (Reitershan und Ley, 2004; Gando et al., 2005).

Das **Endothel** spielt in der Pathogenese der Sepsis ebenso eine bedeutende Rolle (Hack und Zeerleder, 2001; Dauphinee und Karsan, 2006). Die Aktivierung der Endothelzellen erfolgt direkt über die Einwirkung von LPS oder über die Vermittlung der ausgeschütteten Zytokine (Henneke und Golenbock, 2002). Unter dem Einfluss von inflammatorischen Faktoren ändert sich die Morphologie und Funktion der Endothelzellen. Entscheidend für das Ausmaß dieser Reaktionen ist die Art des Pathogens sowie die Genetik, das Geschlecht, das Alter und die Komorbidität des Organismus. Neben der Vakuolisierung des Zellkerns kann eine Schwellung und Fragmentation des Zytoplasmas beobachtet werden, die bis zur Zerstörung der Zelle reichen kann. Funktionell ermöglichen die präsentierten Selektine die Anheftung und Diapedese der Leukozyten. Das Endothel erleidet den Verlust der Barrierefunktion, woraus eine „Brüchigkeit“ der Gefäße mit Ödembildung resultiert (Aird, 2003). Die Induktion der induzierbaren NO-Synthase verursacht eine erhöhte Sezernierung von NO, einem starken Vasodilatator. Durch die Freisetzung von „Tissue Factor“ aus den Endothelzellen wird das Gerinnungssystem aktiviert (Holmes et al., 2003).

Über den „Tissue Factor“, der von Endothelzellen und aktivierten Monozyten produziert wird, kommt es zur Einbeziehung des **Gerinnungssystems** in die Abwehrreaktion. Es folgt die Aktivierung von Thrombin und die Ablagerung von Fibrin im Gewebe, was zur Bildung von Mikrothromben führt. Aktivierte Gerinnungsfaktoren weisen starke proinflammatorische Eigenschaften auf. Es besteht eine enge Interaktion zwischen Inflammation und Gerinnungssystem (Riedemann et al., 2003; Levi et al., 2004). Endogene Inhibitoren des Gerinnungssystems tragen zur Wiederherstellung der Homöostase bei. Antithrombin, das akute Phase Protein und der „tissue-factor inhibitor“ steuern dabei einer überschießenden Reaktion entgegen (Holmes et al., 2003; Hoffmann et al., 2006). Eine maximale Aktivierung des Gerinnungssystems führt zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC), die ein Wegbereiter zur Entstehung des septischen Schocks darstellt (Opal und Esmon, 2003).

Die Sepsis ist eine Erkrankung der **Mikrozirkulation** (Bateman et al., 2003; Vollmar et al., 2006). Die Regulation der mikrozirkulatorischen Perfusion ist ein komplexes Zusammenspiel von neuroendokrinen, parakrinen und mechanosensorischen Signalkaskaden, die im septischen Krankheitsgeschehen massiv beeinflusst werden (siehe Abb. 2; Spronk et al., 2004).

Eine Ursache für die gestörte mikrozirkulatorische Perfusion ist die Verlegung der Strombahn durch Mikrothromben (Bauer, 2004). Weiterhin hat die gesteigerte Freisetzung von NO aus dem Endothel einen großen Anteil am Versagen der vasomotorischen Funktion. Die daraus resultierende Hypotension ist mit einer schlechten Prognose für den Patienten vergesellschaftet (Hoffmann et al, 2006). Die Hypoxie des Gewebes während einer septischen Erkrankung resultiert nicht allein aus dem mangelnden Sauerstoffangebot durch Minderperfusion. Auch die Sauerstoffverarbeitung im Rahmen der Atmungskette in den Mitochondrien der Zellen ist gestört (Fink, 1997; Fink, 2000; Fink, 2001; Fink, 2002). Letztendlich kommt es zum massiven Zelltod durch Apoptose, Nekrose und Aponekrose, der zur Organdysfunktion führt.

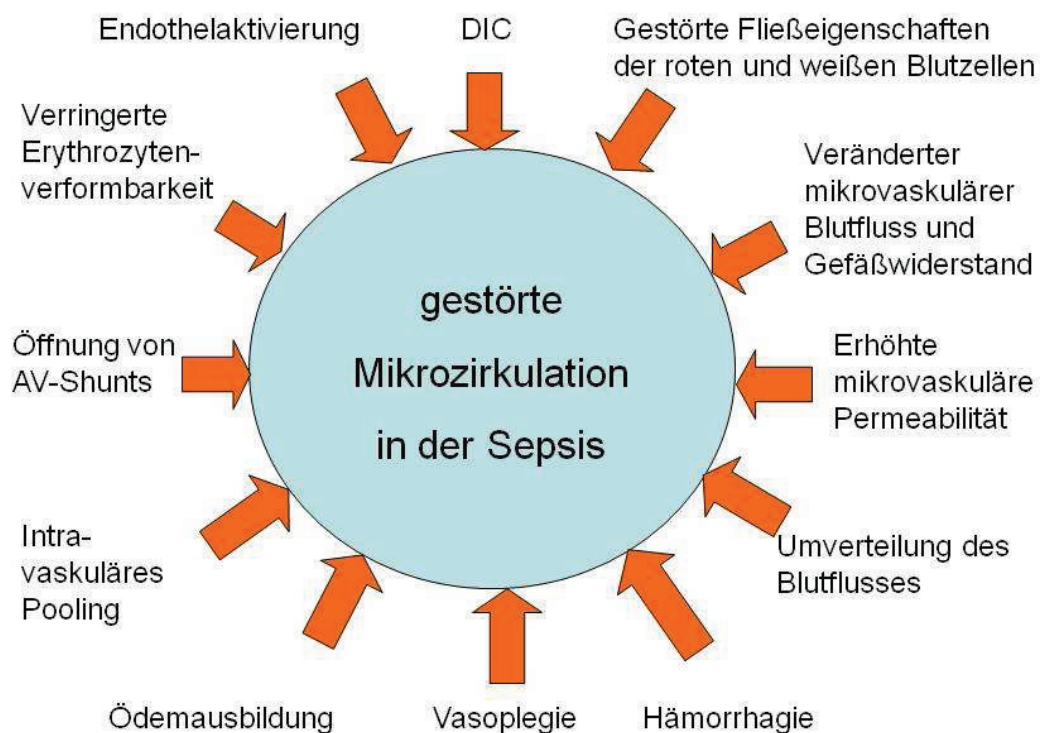


Abb.: 2 Pathomechanismen des Mikrozirkulationsversagens in der Sepsis. DIC=disseminierte intravasale Gerinnung (modifiziert nach Spronk et al., 2004)

1.1.5.3 Das septische Multiorganversagen

Todesursache für Patienten mit einer septischen Erkrankung ist das **Multiorganversagen (MODS)**. Typischerweise entwickelt sich das Funktionsversagen zunächst in einem Organ

und schreitet dann voran. Es existiert ein enger Zusammenhang zwischen der Mortalität und der Anzahl der Organe in Dysfunktion (Cohen, 2002). Verschiedene Pathomechanismen der Sepsis führen in das Multiorganversagen. Die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierte Überaktivität von Granulozyten, die Endothelschädigung, die Hyperkoagulation und die gestörte Mikrozirkulation führen synergetisch zur Organschädigung. Im Rahmen einer sich zunehmend steigernden Entzündungsreaktion kommt es, wie schon erwähnt, auch zur Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, die dem Geschehen entgegen wirken. Nachdem der Organismus mit einer hyperinflammatorischen Reaktion auf die drohende Gefahr reagiert hat, kommt es zur Ausbildung einer Refraktärphase, in der die Produktion der Zytokine stark vermindert ist. Gerät der Regulationsmechanismus nach einer überschießenden Immunreaktion aus der Balance, folgt eine Phase der Immundepression, die mit der Einschränkung oder vollständigen Aufhebung der Abwehrfunktionen einhergeht (Riedemann et al., 2003). Neben der stark erniedrigten Ausschüttung von Zytokinen kann in dieser Phase eine umfangreiche Apoptose von Lymphozyten beobachtet werden (Hotchkiss et al., 2005). Der Organismus ist nicht mehr in der Lage, adäquat auf Infektionen zu reagieren. Aus dem Zusammenspiel aller Schädigungen des Organismus resultiert das septische Multiorganversagen. Sind vier oder fünf Organe betroffen, führt dies mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% zum Tod (Cohen, 2002).

1.1.6 Therapie

Die schwere Sepsis und der septische Schock weisen aktuell weiterhin sehr hohe Mortalitätsraten auf. Die drei Basissäulen in der Behandlung von septischen Erkrankungen bilden die kausale, die supportive und die adjunktive Therapie (Dellinger et al., 2004). Die kontinuierliche Forschung in den letzten Jahren ermöglichte eine immer weiter reichende Einsicht in die komplexe Pathophysiologie der Sepsis. Diese neuen Erkenntnisse bieten wiederum Ansatzpunkte für mögliche Therapien. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie der schweren Sepsis oder des septischen Schocks sind vor allem die rechtzeitige Diagnosestellung und ein speziell auf den Patienten zugeschnittenes Behandlungspaket (Vincent et al., 2006).

1.1.6.1 *Kausale Therapie*

Die Fokussanierung ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie der schweren Sepsis und des septischen Schocks. Zu den Maßnahmen gehören unter anderem die Inzision bzw. die CT-gestützte Drainage von Abszessen, Wunderöffnung, Nekrotomie oder Amputationen. Dadurch wird eine Keimreduktion erreicht und deren weitere Streuung verhindert (Reinhart et al., 2006).

Eine frühe intravenöse, kalkulierte und speziell auf den Patienten ausgerichtete Antibiotikatherapie reduziert die Letalität bei septischen Patienten signifikant (Hanon et al., 2002; Leone et al., 2003; Garnacho-Montero et al., 2003). Die Behandlung sollte frühest möglich nach der Abnahme von Blutkulturen, das heißt innerhalb der ersten Stunde nach Diagnosestellung, beginnen (Dellinger et al., 2004). Es wird empfohlen, alle 48 bis 72 Stunden die Therapie neu zu evaluieren, um die antimikrobiellen Spektren zu verengen und damit das Risiko für Resistenzen, Toxizität und auch die Kosten zu verringern. Die Dauer der Behandlung richtet sich nach dem klinischen Bild, sollte aber sieben Tage nicht überschreiten (Reinhart et al., 2006).

1.1.6.2 *Supportive Therapie*

Mit einer hämodynamischen Stabilisierung soll beim Patienten ein adäquates zelluläres Sauerstoffangebot erreicht werden. Als erste Maßnahme wird eine Volumensubstitution vorgenommen. Kann damit kein adäquater arterieller Mitteldruck (> 95 mmHg) erzielt werden, sollten vasopressorische Katecholamine zur Anwendung kommen. Eine frühe hämodynamische Stabilisierung mit der Zielgröße einer zentralvenösen Sättigung $> 70\%$ führt zu einer signifikanten Reduktion der Krankenhaussterblichkeit (Hörner et al., 2004). Etwa 25-42 % der Patienten mit einer schweren Sepsis entwickeln ein akutes Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) (Balk et al., 2001). Die Entscheidung zur Intubation sollte bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock großzügig gestellt werden. Basisziel des Airwaymanagement und der Beatmung ist es, die oximetrische Sauerstoffsättigung bei über 90% zu halten. Zu den Indikationen zählen:

- schwere Tachypnoe (Atemfrequenz > 35)

- muskuläre Erschöpfung (Einsatz der Atemhilfsmuskulatur)
- eingeschränkte Vigilanz
- Sättigungsabfall $\leq 90\%$ trotz Sauerstoffinsufflation.

Patienten, die ein ARDS ausgebildet haben, sollten mit niedrigen Atemzugvolumina (6ml/kg Standardkörpergewicht) und einem Plateaudruck < 30 cm H₂O beatmet werden. Die mechanische Beatmung sollte immer mit positiv endexpiratorischen Drücken (PEEP) durchgeführt werden (Reinhart et al., 2006). Eine lungenprotektive Beatmung führt bei Intensivpatienten zu einem verminderten Zytokinanstieg durch die Beatmung (Ranieri et al., 1999).

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass eine intensivierete Insulintherapie zur Herstellung der Normoglykämie bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock sinnvoll ist. Die Therapie mit Insulin reduziert die Mortalitätsrate bei septischen Patienten mit Multiorganversagen unabhängig von einem zuvor bestandenen Diabetes mellitus (Hotchkiss und Karl, 2003). In einer Studie von *Van den Berghe* konnte ein Absinken der Mortalität von 20,2 % bei konventioneller Therapie auf 10,6 % bei zusätzlicher intensiver Insulintherapie gezeigt werden (van den Berghe et al, 2001). Zu den supportiven Therapien gehören zudem die Thrombose- und Ulkusprophylaxe sowie die Optimierung des Ernährungszustandes (Reinhart et al., 2006).

1.1.6.3 *Adjunktive Therapie*

In mehreren randomisierten und kontrollierten Studien konnte mit einer kurzen und hochdosierte Steroid-Gabe kein Überlebensvorteil gezeigt werden (Cronin et al., 1999; Lefering und Neugbauer, 1995). Der Einsatz von niedrig dosiertem Hydrokortison zeigte in verschiedenen Studien einen positiven Effekt und wird als Standardtherapie für bestimmte Patienten empfohlen (Chadda und Annane, 2001). Eine Therapie mit Hydrokortison kann empfohlen werden, wenn eine relative Nebenniereninsuffizienz gesichert ist (Reinhart et al., 2003). Dabei zeigte eine Cross-over Studie, dass die Gabe von Hydrocortison sowohl zu einer verminderten proinflammatorischen als auch zu einer geringeren antiinflammatorischen Immunantwort führt (Keh et al., 2003).

Die Gabe von rekombinantem aktiviertem Protein C (rhAPC) wird unter Beachtung der Kontraindikationen bei Patienten mit Versagen von mindestens zwei Organen empfohlen. Die Wirkung resultiert aus einer Reduktion der Thrombinbildung sowie der engen Verknüpfung zwischen dem Gerinnungssystem und der inflammatorischen Kaskade (Hotchkiss und Karl, 2003). Zudem wird vermutet, dass rhAPC durch eine Hemmung der Apoptose den Sepsisverlauf positiv beeinflussen kann (Joyce et al., 2001; Cheng et al., 2003). Mit dem Einsatz von rhAPC konnte in einer klinischen Studie eine Letalitätsreduktion von 6 % erreicht werden (Bernard et al., 2001). Dabei ist die prozentuale Letalitätssenkung durch rhAPC bei Patienten mit Mehrorganversagen deutlich höher als für Patienten mit Versagen nur eines Organs (Dhainaut et al., 2003).

Der Einsatz von Antithrombin (Warren et al., 2001), Wachstumshormonen (Takala et al., 1999) oder Ibuprofen (Bernard et al., 1997) zeigte in Studien keinen Behandlungsvorteil und wird somit nicht empfohlen (Reinhart et al., 2006).

1.1.6.4 Zukünftige Therapieoptionen

Zielpunkte für neue Therapieansätze sind vor allem Moleküle in der immer besser erforschten Signalkaskade der Inflammation und der Apoptose (Hörner et al., 2004). Die möglichen Ansatzpunkte der Zukunft sind sehr vielfältig, weshalb nachfolgend die wichtigsten vorgestellt werden.

Große Aufmerksamkeit wird in der Forschung den Anti-Endotoxin-Strategien zu Teil. Die Lipoproteine LDL, HDL sowie das Apolipoprotein A sind in der Lage mit LPS Komplexe zu bilden, welche wiederum aus dem Blutstrom entfernt werden können. So stellt die Gabe von Lipoproteinen ein neues Therapiekonzept dar, welches bereits erste Erfolge aufweisen konnte. In Versuchen mit Tieren und humanen Probanden konnten nach dem Einsatz von HDL der grippeähnliche Symptomkomplex der Endotoxinämie sowie die Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-8 reduziert werden (Pajkrt et al., 1996). Zu weiteren Anti-Endotoxin-Strategien zählt die Gabe von Anti-CD14-Antikörpern oder die extrakorporale Adsorption von Endotoxin (Vincent et al., 2006).

Der „macrophage migration inhibiting factor“ (MIF) ist ein proinflammatorischer Mediator, der durch eine Modulation der TLR4-Expression in die Zytokin-Signal-Kaskade der Sepsis eingreift (Vincent et al., 2006). Die Neutralisation von MIF durch Antikörper konnte im Mausmodell die TNF- α -Konzentrationen und die Letalität signifikant senken (Calandra et al., 2000; Martin, 2000).

Das „high mobility group box protein 1“ (HMGB1) ist ein verzögert ausgeschüttetes proinflammatorisches Zytokin. Es ist erstmals acht Stunden nach Gabe von LPS im Serum nachweisbar und stellt damit ein geeignetes Ziel für den Einsatz von Antikörpern dar (Wang et al., 2001). In einer Tierstudie konnte bereits eine erhöhte Überlebensrate nach Therapie mit HMGB1-Antikörpern erzielt werden (Wang et al., 2004).

Der Komplementfaktor C5a ist ein starker Aktivator der proinflammatorischen Reaktion (Riedemann et al., 2003). Im Tiermodell der Sepsis konnte die durch C5a vermittelte Inflamationsreaktion sowohl durch die Gabe von C5a-Antikörpern als auch durch die Blockade des C5a-Rezeptors verringert werden. Zugleich konnte in diesen Versuchen die Bakteriämie reduziert und das Überleben der Versuchstiere verbessert werden (Czermak et al., 1999; Huber-Lang et al., 2002; Riedemann et al., 2002).

1.2 Das akute Leberversagen

Die Leber kann vor allem durch die Produktion von Zytokinen und Gerinnungsfaktoren als eines der zentralen Organen in der Pathophysiologie des septischen Schock sowie des Multiorganversagen angesehen werden. Eine Störung der Leberfunktion wird bei etwa 20-25% der Patienten im Rahmen einer schweren Entzündungsreaktion beobachtet (Kapral et al., 2005). Kommt es im Rahmen einer Sepsis zur Ausbildung eines akuten Leberversagens, ist die Prognose der Erkrankung sehr schlecht (Angus et al., 2001).

1.2.1 Definition

Das akute Leberversagen ist eine komplexe, multisystemische Erkrankung, die sich in Folge einer akuten Leberschädigung entwickelt. Innerhalb kurzer Zeit kommt es zur Ausbildung der

Symptome einer Koagulopathie und einer Enzephalopathie. Die Begriffe hyperakut, akut und subakut sind durch den Zeitpunkt des Auftretens der Enzephalopathie definiert: innerhalb von 7 Tagen, 8 bis 28 Tagen oder später als 28 Tagen nach der Leberschädigung (O’Grady, 2005). Ob das Leberversagen im Verlauf reversibel oder progredient-irreversibel ist, hängt von der Grunderkrankung, dem Lebensalter, einer Vorschädigung der Leber und dem Auftreten von Komplikationen ab (Berr et al.). Die Diagnose des akuten Leberversagens basiert auf drei Säulen:

- akute Entwicklung einer schweren Leberfunktionsstörung mit Koagulopathie und Ikterus
- Präsenz einer hepatischen Enzephalopathie
- Ausschluss einer vorbestehenden chronischen Lebererkrankung.

Zur korrekten Diagnose müssen alle drei Kriterien erfüllt sein (Rifai und Bahr, 2003).

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Leberversagens ist vielgestaltig (siehe Tab. 4). Einige Ursachen wurden erst in den letzten Jahren identifiziert, darunter die antiretrovirale Therapie bei HIV-Patienten sowie pflanzliche Arzneien wie Kava-Kava-Produkte. In Deutschland beruht ein Leberversagen am häufigsten auf Virushepatitiden und Medikamenteneinnahmen. Bei einem signifikanten Anteil der Patienten (ca. 20-40%) lässt sich keine spezifische Ätiologie identifizieren, was als kryptogenes akutes Leberversagen bezeichnet wird (Rifai und Bahr, 2003). Bei den Ursachen des akuten Leberversagens gibt es geographische Variationen. So stellen in Großbritannien und den USA Paracetamolintoxikationen und andere Medikamentenreaktionen die häufigsten Ursachen dar (O’Grady, 2005).

Viral	Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C (Ko/Superinfektion bei Hepatitis B), Hepatitis E, Zytomegalievirus, Ebstein-Barr-Virus, Herpes-Simplex-Virus, Varizella-Zoster-Virus, humanes Herpesvirus 6, Parvo B19, Parainfluenza, Adenovirus, Gelbfieber, Q-Fieber hämorrhagische Fieber (Dengue-Virus, Hantaan-Virus)
Idiosynkratisch	Halogenierte Kohlenwasserstoffe (Halothan, Isofluran, Enfluran) Kumarine, Methyldopa, Phenytoin, Carbamazepin, Valproat, Rifampicin, Penicillin, Sulfonamide, Chinolone, Ketokonazol, Terbinafin, nichtsteroidale Antiphlogistika, hochaktive antivirale Therapie (HAART), Glitazone, Thiouracil, Allopurinol, Amiodaron, Dihydralazin, MAO-Hemmer, trizyklische Antidepressiva

	siva, pflanzliche Arzneimittel (z.B. Kava-Kava)
Toxisch-dosisabhängig	Paracetamol, Isoniazid, Tetrazykline, Methotrexat, Tetrachlorkohlenstoff, industrielle Lösungsmittel, Amphetamine (z.B. Ecstasy), Kokain, Amanita-Toxin (Knollenblätterpilz), Bacillus-cereus-Toxin
Toxisch-synergistisch	Ethanol + Acetaminophen, Barbiturate + Acetaminophen, Isozianid + Rifampicin, Trimethaprim + Sulfammethoxazol, Amoxizillin + Clavulansäure
Metabolisch	M. Wilson, α -1-Antitrypsinmangel, hereditäre Galaktosämie, hereditäre Tyrosinämie, Fructoseintoleranz, Reye-Syndrom (Salisylate), nichtalkoholische Steatohepatitis
Schwangerschaftsassoziiert	Akute Schwangerschaftsfettleber, HELLP-Syndrom (hemolysis, elevated liver tests, low platelets)
Vaskulär	Budd-Chiari-Syndrom, Lebervenenverschlusskrankheit, Schockleber, akutes Rechtsherzversagen, Herzbeuteltamponade, Sichelzellanämie
Diverses	Autoimmunhepatitis, maligne Infiltration, Hyperthermie, Sepsis, kryptogen

Tab. 4 : Ätiologie des akuten Leberversagens (nach Rifai und Bahr, 2003)

1.2.3 Pathophysiologie

1.2.3.1 Apoptose, Nekrose und ihre Zwischenformen

Das akute Leberversagen ist meist Folge von ausgedehnten Leberzellnekrosen und -apoptosen (Berr et al.). Mit dem Verlust einer kritischen Hepatozytenmasse kommt es zur Ausbildung des klinischen Bildes mit Gerinnungsstörungen, Ikterus, Hirnödem und Koma. Synthese- und Stoffwechsellleistungen sowie Exkretionsfunktionen können nicht mehr aufrechterhalten werden (Bauer et al., 2004). Für die Ausbildung des akuten Leberversagens sind sowohl die Apoptose als auch die Nekrose von Bedeutung (Rutherford et al., 2008). Lange Zeit wurden diese beiden Formen des Zelltodes als völlig verschiedene Prozesse mit unterschiedlichen biochemischen, morphologischen und funktionellen Charakteristika betrachtet (Wyllie et al., 1980; Majno und Joris, 1995; Schwarz und Bennet, 1995). Die Nekrose folgt auf einen metabolischen Zusammenbruch der Zelle, an den sich unmittelbar eine Erschöpfung der ATP-Reserven sowie eine Ionendysregulation anschließt (Lemasters, 1999). Morphologisch kommt es zur Ausbildung einer Zellschwellung mit einzelnen Ausbuchtungen der Plasmamembran, die als „blebs“ bezeichnet werden und wohlmöglich Folge einer gestörten Volumenkontrolle und einer Schädigungen des Zytoskeletts darstellen. Es folgen die Depolarisation der Mitochondrien, der lysosomale Zusammenbruch, die zusammen mit einer sich steigernden Formation der „blebs“ letztendlich zur Ruptur der Plasmamembran führen (Gores et al., 1990). Die

Ausschwämmung von intrazellulären Proteinen, Metaboliten und Ionen führt zur Ausbildung eines inflammatorischen Herdes (Jaeschke und Lemasters, 2003). Im Gegensatz dazu stellt die Apoptose ein besonderes Werkzeug der Zelldifferenzierung dar, welches überflüssige sowie nicht benötigte Zellen gezielt entfernt. Spezielle Signale, wie TNF- α oder FasLigand, initiieren apoptotische Vorgänge, die mit der Aktivierung von Cystein-Proteasen, sogenannten Caspasen, einhergehen (Lemasters, 1999). Obwohl diese beiden Formen des Zelltodes so unterschiedlich erscheinen, gibt es zwischen ihnen verbindende Elemente. So konnte gezeigt werden, dass der gleiche toxische Stimulus sowohl Nekrose als auch Apoptose zur Folge haben kann. Wie die Zelle zu Grunde geht, ist allein vom Ausmaß des Stimulus abhängig (Bonfoco et al., 1999; Hampton und Orrenius, 1997). Auch in ihren Signalwegen zeigen Apoptose und Nekrose Gemeinsamkeiten. Beide Formen des Zelltods werden durch eine Schädigung an den Mitochondrien, der „mitochondrial permeability transition“ ausgelöst. Welche Form des Zelltodes sich nun anschliesst, ist vom energetischen Zustand der Zelle, der Verfügbarkeit von ATP abhängig. Geht die zelluläre Schädigung mit einer akuten ATP-Depletion einher, kommt es zur Ausbildung von Nekrose. Ist trotz Schädigung der zelluläre ATP-Bedarf gesichert, folgt die Apoptose. Nun ist es denkbar, dass die ATP-Reserven erst im Verlauf des Zellsterbens erschöpft sind, wodurch sich eine sekundäre Nekrose nach anfänglicher Apoptose erklären lässt (Jaeschke und Lemasters, 2003). Beide Formen des Zelltodes existieren oft nebeneinander, wobei es zu kontroversen Diskussionen über die dominante Art des Zelltods in den verschiedenen Krankheitsbildern gibt (Jaeschke und Lemasters, 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Apoptose und Nekrose nicht nur gemeinsam im gleichen Gewebe, sondern ihre Charakteristika auch gleichzeitig in einer Zelle zu beobachten sind (Lemasters, 1999). Es wurde hypothesiert, dass beide Formen des Zelltods lediglich die Extreme eines fließenden Übergangs zwischen beiden Formen des Zelltods darstellen (Schwartz et al., 1993; Leist und Nicotera, 1997, 1998; Raffray und Cohen, 1997). Daher bedurfte es einer neuen Nomenklatur dieser Zwischenformen, die letztendlich als „necroptosis“ (Lemasters, 1999) oder aponecrosis (Formigli et al., 1999; Vollmar und Menger, 2009) bezeichnet wurden.

Versuche an endotoxämischen Ratten haben gezeigt, dass die Apoptose eine Schlüsselrolle beim septischen Leberversagen spielt (Eipel et al., 2004; Li et al., 2004; Le Minh et al., 2007). Es wird vermutet, dass der dominierenden Phase der Nekrose eine Phase mit vorherrschender Apoptose bei der Gewebsschädigung zeitlich vorausgeht (Jaeschke et al., 2004). Bei allen

Formen des Zelltodes, der Nekrose, der Apoptose sowie ihren Zwischenformen, spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle (Kroemer et al., 1998; Jenschke et al., 2004).

1.2.3.2 *Inflammationsreaktion und Mikrozirkulationsversagen*

Eine massive Leberschädigung im Rahmen einer Sepsis (Eipel et al., 2004) oder Ischämie/Reperfusion (Vollmar et al., 1995) zieht eine lokale und systemische Inflammation nach sich, bei der Makrophagen und Neutrophile in das Mikrogefäßsystem der Leber einwandern. Durch die von Mediatoren vermittelte Diapedese gelangen die Entzündungszellen ins Parenchym, wo sie durch Induktion von Apoptose und Nekrose erheblichen Schaden verursachen.

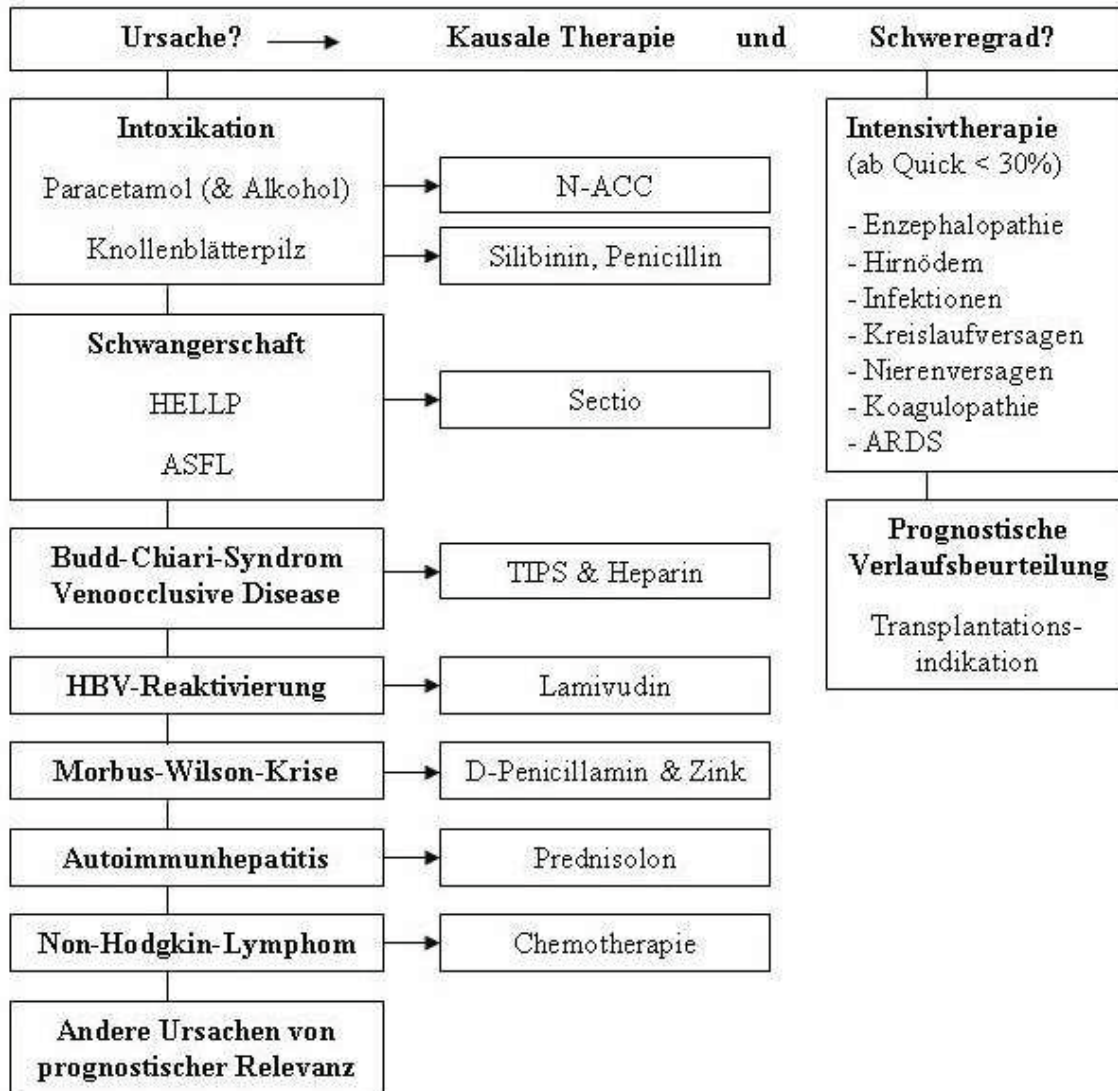
Die nichtparenchymatösen Kupffer-Stern-Zellen produzieren innerhalb einer Inflammationsreaktion ebenfalls zytotoxische Mediatoren, wie z.B. ROS, proinflammatorische Zytokine und Chemokine und tragen damit zur Zellschädigung bei (Jenschke et al., 2002). Als ortständige Makrophagen sind sie zusätzlich in der Lage, zirkulierende Bakterien und deren Produkte zu eliminieren (Bauer et al., 2004).

Mit etwa 25% des Herzzeitvolumens gehört die Leber zu den am besten durchbluteten Organen des Körpers (Bauer et al., 2004). Als Pathomechanismus der Leberdysfunktion sind Perfusionsstörungen von großer Bedeutung (Berr et al.). Das sich im Laufe eines SIRS entwickelnde Mikrozirkulationsversagen ist für die Ausbildung des akuten Leberversagens wegweisend. Bei endotäxämischen Ratten und Mäusen mit starker Leberschädigung konnten massive Ausfälle der sinuidalen Perfusion gezeigt werden (Eipel et al., 2004; Eipel et al., 2007; Le Minh et al., 2007).

1.2.4 **Therapie**

Patienten mit akutem Leberversagen sollten ab einem Quickwert unter 30% oder einer Enzephalopathie 2. Grades auf die Intensivstation eines Lebertransplantationszentrums verlegt werden (Berr et al.). Hauptgegenstand der Behandlung des akuten Leberversagens sind allgemeine Maßnahmen sowie die Prophylaxe und Therapie von Komplikationen. Für einige

Ätiologien sind jedoch spezifische Therapiemaßnahmen etabliert (Rifai und Bahr, 2003). Einen Überblick zur simultanen Abklärung, Therapie und Verlaufsbeurteilung des akuten Leberversagens zeigt Tabelle 5.



Tab. 5: Algorithmus zur simultanen Abklärung, Therapie und Verlaufsbeurteilung des akuten Leberversagens. N-ACC = N-Acetylcystein; HELLP-Syndrom = hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets; ASFL = akute Schwangerschaftsfettleber; ARDS = Acute respiratory distress syndrome; HBV = Hepatitis B-Virus; TIPS = transjugulärer intrahepatischer Shunt. (Modifiziert nach Berr und Bahr, 2003)

1.2.4.1 Kausale Therapie

Spezifische Therapiemaßnahmen sind nur für wenige Ursachen des Leberversagens möglich. Ob eine der Ursachen für den Patienten in Betracht kommt, muss unverzüglich mit Hilfe von Laboruntersuchungen, bildgebenden Verfahren, Leberhistologie und ggf. mittels Minilaparoskopie abgeklärt werden, um eine Therapie schnellstmöglich beginnen zu können (Berr et al.).

Zu den spezifischen Therapiemaßnahmen beim akuten Leberversagen gehören die Gifteliminationen bei Intoxikationen, wie die frühzeitige hochdosierte N-Acetyl-Cystein (N-ACC)-Therapie bei Paracetamolintoxikation und die Gabe von Penicillin und Silibinin bei Amatoxinvergiftung (Knollenblätterpilz). Bei fulminanter Hepatitis B mit Leberversagen kann die antivirale Therapie mit Lamivudin hilfreich sein und bei Herpes-simplex-Virus- oder Zytomegalie-Hepatitis die Gabe von Aciclovir bzw. Ganciclovir. Auch die Entbindung beim schwangerschaftsassozierten Leberversagen im Rahmen einer akuten Schwangerschaftsfettleber, einer Eklampsie oder einem HELLP-Syndrom ist als kausale Therapie zu werten und sollte frühstmöglich angestrebt werden (Bauer et al., 2004).

1.2.4.2 *Allgemeine therapeutische Maßnahmen*

Zum klinischen Bild eines akuten Leberversagens gehören schwere Gerinnungsstörungen, bei denen auch die Inhibitoren des Gerinnungssystems vermindert sind. Durch einen erhöhten Verbrauch der Gerinnungsfaktoren entwickelt sich begleitend häufig eine disseminierte intravasale Koagulopathie. Obwohl kontrollierte Studien dazu fehlen, wird mit Orientierung an der Prothrombinzeit eine Substitutionsbehandlung mit gefrorenem Frischplasma oder rekombinantem aktiven Faktor VII empfohlen. Angestrebt werden dabei Quickwerte von über 20% (Bauer et al., 2004). Ohne Gerinnungssubstitution werden bei bis zu einem Drittel der Patienten spontane Blutungen beschrieben, wobei intrazerebrale und intraabdominelle Blutungen besonders gefürchtet sind (Rifai und Bahr, 2003). Um das Risiko für gastrointestinale Blutungen zu minimieren, sollte zusätzlich eine Säuresuppression mit H₂-Rezeptorantagonisten und Protonenpumpenhemmern durchgeführt werden. (Macdougall et al., 1977; Cook et al., 1996).

Zur Ernährungstherapie im akuten Leberversagen liegen sehr wenige Daten vor. Im Allgemeinen orientiert sie sich aber an den aktuellen Konzepten der Ernährung von Intensivpatienten. Primäre Ziele sind die Verhinderung bzw. Abschwächung einer Katabolie und der Erhalt der Glukosehomöostase (Bauer et al., 2004). Durch den erhöhten intrakraniellen Druck wird im Zustand des akuten Leberversagens eine erhöhte Ausschüttung endogener Kortikosteroide und Katecholamine bewirkt, was zu einem erhöhten Grundumsatz führt (Schneeweiss et al., 1993). Um das Risiko für die Entwicklung einer Sepsis zu minimieren, wird eine enterale

Ernährung empfohlen (O'Grady, 1995). Bei den Patienten sollte zudem ein metabolisches Monitoring vorgenommen werden. Neben regelmäßigen Blutzuckermessungen sollte eine Kontrolle der Laktat-, Ammoniak- und Triglyzidwerte erfolgen. Daneben wird eine Substitution von wasser- und fettlöslichen Vitaminen sowie Spurenelementen empfohlen (Bauer et al., 2004).

In Studien mit der Gabe von hochdosiertem N-Acetylcystein (Walsh et al., 1998) und Prostaglandin E₁ (Sterling et al., 1998) konnte bei Patienten im akuten Leberversagen kein positiver Effekt hinsichtlich der Mortalität festgestellt werden.

1.2.4.3 *Therapie von Komplikationen*

Die prognosebestimmenden Faktoren für das akute Leberversagen sind die extrahepatischen Komplikationen, deren Art und Ausprägung von der Dynamik und der Ätiologie des Leberversagens abhängen. Um Komplikationen weitestgehend zu vermeiden, sollten ein engmaschiges Monitoring sowie prophylaktische und frühzeitige Interventionen zur Behandlungsstrategie gehören.

Alle Patienten mit einem akuten Leberversagen weisen per definitionem mindestens eine Enzephalopathie 1. Grades auf. Infolge des erhöhten Ammoniakspiegels kommt es durch das Anschwellen der Astroglia zur Ausbildung eines Hirnödems, welches die häufigste Todesursache beim akuten Leberversagen ist (Rifai und Bahr, 2003). Die Infusion von Mannitol, kontrollierte Hyperventilation und die Gabe von Thiopental bei erhöhter Krampfbereitschaft haben sich als hilfreiche Maßnahmen gegen das Hirnödem etabliert (Richardson und Bellamy, 2002). Eine neue Therapieoption stellt die Hypothermie dar, die in Studien eine Verminderung des intrakraniellen Drucks bewirken konnte (Jalan et al., 1999; Jalan et al., 2001).

Infektionen sind die zweithäufigste Todesursache bei Patienten mit akutem Leberversagen (Rifai und Bahr, 2003). Bakterielle Infekte werden bei bis zu 80%, Pilzinfektionen bei bis zu 33% der Patienten gefunden. Auf der Basis dieser Datenlage sollte bei allen Patienten mit akutem Leberversagen eine prophylaktische Antibiose durchgeführt werden, können dadurch insbesondere auch positive Effekte auf die Progression der hepatischen Enzephalopathie erreicht werden (Rolando et al., 1996).

Bis zu zwei Drittel der Patienten mit akutem Leberversagen entwickeln in seinem Verlauf ein akutes Nierenversagen, bei der eine frühzeitige maschinelle Nierenersatztherapie indiziert ist (Moore, 1999).

1.2.4.4 *Extrakorporale Leberersatzverfahren*

Die verschiedenen Partialfunktionen der Leber sind durch intensivmedizinische Therapien unterschiedlich gut behandelbar. Die Proteinproduktion kann nur bis zu einem bestimmten Grad ersetzt werden, der Säure-Basen-Haushalt und der Glukosestoffwechsel sind in der Regel gut einstellbar. Am schwierigsten gestaltet sich aber der Ersatz der Entgiftungsfunktion. Seit den 1970er Jahren wurde analog zur Dialysetherapie ein maschineller Ersatz für die Detoxifikation gesucht. Vom Ansatz her lassen sich rein maschinelle Verfahren von den bioartifiziellen Verfahren auf Basis von Hepatozyten unterscheiden (Rifai und Bahr, 2003).

Bei den rein maschinellen Verfahren wird ohne eine Substitution der Lebersynthese über eine Filtration die hepatische Entgiftung unterstützt („Leberdialyse“). Als neues Konzept ist in den letzten Jahren das in Rostock entwickelte MARS-Verfahren (Molecular Adsorbent Recirculation System) eingeführt worden, bei dem neben wassergebundenen Substanzen auch albumingebundene Bestandteile aus dem Blut entfernt werden können. In Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem akut-auf-chronisch-Leberversagen von der MARS-Therapie profitieren (Mitzner et al., 2001; Santoro et al., 2007). Bei Patienten mit Multiorganversagen und Sepsis konnten hingegen keine positiven Effekte gezeigt werden (Wilmer et al., 2002; Rittler et al., 2004).

Ziel der bioartifiziellen Systeme ist es, eine ausreichende Menge an funktioneller Leberzellmasse zur Verfügung zu stellen. Dazu werden in einer speziellen Matrix Hepatozytenkulturen gehalten, die mit Kapillaren durchzogen sind, in denen das Patientenblut zirkuliert. Voraussetzungen für das Funktionieren des Verfahrens sind ein effektiver Austausch der Nährstoffe, Metabolite und Toxine in beide Richtungen sowie die Aufrechterhaltung der Zellfunktion der Hepatozyten (Rifai und Bahr, 2003). Zu den bioartifiziellen Verfahren gehört das in Berlin entwickelte Modular Extracorporeal Liver Support System (MELS), das auf der Basis von porcinen Hepatozyten konstruiert wurde. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die

Überbrückung des akuten Leberversagens bis zur Transplantation mit Hilfe des MELS möglich ist (Sauer et al., 2003).

1.2.4.5 Lebertransplantation

Bei Patienten mit infauster Prognose ist die Lebertransplantation die einzige Möglichkeit, die Überlebensrate zu verbessern. Die Indikation zur Transplantation ist gegeben, wenn die Wahrscheinlichkeit des Spontanüberlebens unter 20% liegt. Grundlage für die Indikationsstellung sind die vom King's College in London und der Arbeitsgruppe in Clichy erarbeiteten Kriterien (siehe Tab. 6 und 7; Bauer et al., 2004).

-
- **Paracetamolintoxikation**
 - pH < 7,3 (unabhängig vom Grad der hepatischen Enzephalopathie) oder
 - hepatische Enzephalopathie 3. oder 4. Grades, Prothrombinzeit > 100 s (INR > 6,7), Serumkreatinin > 3,4 mg/dl (300 µmol/l)
 - **Andere Ursachen**
 - Prothrombinzeit > 100 s (INR > 6,7)
 - oder drei der folgenden Kriterien:
 - Prothrombinzeit > 50 s (INR > 4)
 - Serumbilirubin > 17,5 mg/dl (> 300 µmol/l)
 - Intervall zwischen Ikterus und hepatischer Enzephalopathie > 7 Tage
 - Ätiologie: Non-A-non-B-Hepatitis, Halothan, Medikamente
 - Alter < 10 Jahre oder > 40 Jahre
-

Tab. 6: King's College Kriterien zur Prognoseschätzung und Indikationsstellung zur Lebertransplantation bei akutem Leberversagen (Bauer et al., 2004)

-
- Hepatische Enzephalopathie 3. oder 4. Grades
 - Faktor V
 - <30% (wenn Patient älter als 30 Jahre)
 - <20% (wenn Patient jünger als 30 Jahre)
-

Tab. 7: Clichy-Kriterien zur Prognoseabschätzung und Indikationsstellung zur Lebertransplantation bei akutem Leberversagen im Rahmen einer viralen Hepatitis (Bauer et al., 2004)

Kontraindikationen für eine Lebertransplantation stellen die schwere Sepsis, maligne Grunderkrankungen, irreversible Hirnschädigungen und ausgeprägte Begleiterkrankungen dar. Patienten, die mit akutem Leberversagen transplantiert werden, haben mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 60% eine akzeptable Prognose (Bauer et al., 2004; O'Grady, 2005).

Neben der Transplantation von ganzen Organen besteht auch die Möglichkeit, nur einen Teil der Leber zu transplantieren. Vor dem Hintergrund des Mangels an Spenderorganen gewinnen diese Methoden immer mehr an Bedeutung. Bei der Split-Leber-Transplantation wird nur ein Teil der Leber verpflanzt, wobei auch eine Lebendspende möglich ist. Bei der auxiliären partiellen orthotopen Lebertransplantation wird nur ein Teil der Leber durch ein Spenderteilorgan ersetzt. Ziel ist die Überbrückung des akuten Leberversagens bis zur Regeneration des körpereigenen Organs, was unter Umständen ein Absetzen der immunsuppressiven Therapie erlaubt. Die Transplantation von Hepatozyten befindet sich in der klinischen Erforschung und kann als eine zukünftige Therapieoption bewertet werden (Rifai und Bahr, 2003).

Alles in allem stellt die Lebertransplantation für Patienten mit akutem Leberversagen die einzige etablierte Therapie dar. Die extrakorporalen Unterstützungssysteme gewinnen für die Überbrückung („bridging“) bis zur Transplantation immer mehr an Bedeutung. Um die Überlebenszahlen der Patienten mit akutem Leberversagen von derzeit 65% (Khaschab et al., 2007) signifikant erhöhen zu können, bedarf es der Weiterentwicklung bestehender Therapieoptionen und der Entwicklung neuer Therapieansätze.

1.3 Rolle mitochondrialer Proteine beim septischen Leberversagen

Zur Aufrechterhaltung ihrer Funktionen benötigen alle Lebensformen die ständige Verfügbarkeit von Energie. Dabei sind die in der Atmungskette entstehenden energiereichen Phosphoanhydridbindungen im ATP eine universale Energiewährung (Löffler, 2008). Die Prozesse der Atmungskette, bei denen 90% des ATP hergestellt werden (Rolfe und Brown, 1997), finden in speziellen Zellorganellen, den Mitochondrien, statt. Entwicklungsgeschichtlich stammen Mitochondrien von atmungskompetenten Proteobakterien ab, die vor 1,5 Milliarden Jahren eine Symbiose mit anaeroben Archebakterien eingingen (Gray et al., 1999). Sie können bei der Zellteilung nicht de novo entstehen, vielmehr vermehren sie sich autonom in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen durch Abschnürungen aus bereits vorhandenen Organellen. Neben ihrer Hauptaufgabe, der Bereitstellung von Energie in Form von ATP, sind die Mitochondrien an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt, unter anderem am Fettsäureabbau, der Hämsynthese und den Reaktionen der Harnstoffsynthese (Scheffler, 2001). Eine bedeutende Rolle kommt den Mitochondrien bei der Vermittlung und Regulation des Zelltodes zu (Kroemer et al., 1998; Jaeschke et al., 2004). Ihre große Bedeutung für die Zelle und den

gesamten Organismus wird nicht zuletzt durch das Auftreten zahlreicher Erkrankungen, u.a. die Freidreich-Ataxie und die Lebersche Optikusatrophie, die auf mitochondriale Fehlfunktionen zurückzuführen sind, unterstrichen (Wallace et al., 1999; Larsson und Luft, 1999). Die Ursache dieser Erkrankungen liegt in Mutationen der mitochondrialen sowie nuklearen DNA, die für mitochondriale Proteine kodieren (siehe Tabelle 8, Larsson und Luft, 1999; Wallace, 1999). In neueren Studien konnte eine Beteiligung der Mitochondrien bei der Entstehung von Diabetes mellitus (Poulton et al., 2002; Mohlke et al., 2005), Morbus Alzheimer (van der Wahlt et al., 2004), Morbus Parkinson (van der Wahlt et al., 2003), Multiple Sklerose (Kalman, 2006) und Karzinomen (Canter et al., 2005) belegt werden. Auch der mitochondriale Einfluss auf das Altern ist in den Fokus der Forschung gerückt (De Benedictis et al., 1999). Aktuelle Studien zeigen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion während der Sepsis, die einen Beitrag zur Pathophysiologie des septischen Schocks und Organversagen vermuten lässt (Gellerich et al., 2002; Brealey et al., 2004; Crouser et al., 2006; Singer, 2007; Protti und Singer, 2007; Bayir und Kagan, 2008; Exline und Crouser, 2008).

Krankheit	Betroffenes Gen	Klinische Symptome
Lebersche Opticus-Atrophie (LHON)	mtND6-Gen (Untereinheit der NADH-Dehydrogenase)	Blindheit im zweiten Lebensjahrzent
Myoklonusepilepsie mit Veränderungen in der Muskelhistologie (ragged red fibers, MERRF)	mt tRNS ^{Lys} -Gen	Muskelschwäche, Myoklonie, zerebrale Krampfanfälle
Mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose (MELAS)	mt tRNS ^{Leu} -Gen	Episodisches Erbrechen, kortikale Blindheit, Hemiparese, Hemianopsie, Muskelschwäche, Demenz, Kleinwuchs
Friedreich-Ataxie	Frataxin-Gen (kernkodiert)	In der späteren Kindheit auftretende spinocerebellare Heredoataxie
Autosomal dominante optische Atrophie Typ 1 (DOA)	OPA1-Gen (kernkodiert)	Blindheit im zweiten Lebensjahrzent

Tab. 8: Krankheiten mit Ursache in einer mitochondrialen Dysfunktion (modifiziert nach Larsson und Luft, 1999; Wallace, 1999).

1.3.1 Aufbau und Funktion der Atmungskette

Die Tatsache, dass Mitochondrien von zwei Biomembranen umgeben sind, kann durch die Endosymbiontentheorie erklärt werden. Durch diese zwei Lipidmembranen werden die Zell-

organellen in vier Subkompartimente unterteilt: auf die äußere Membran folgt der Intermembranraum, der wiederum durch eine innere Membran von der Matrix abgegrenzt wird. Um ausreichend Raum für die dort lokalisierten Enzymkomplexe zu schaffen, bildet die Innenmembran Einstülpungen in die Matrix, sogenannte Cristae (siehe Abb. 3).

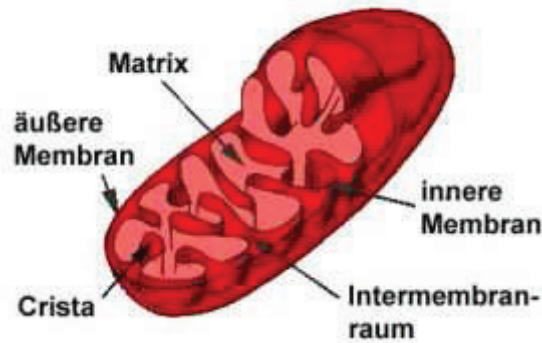


Abb. 3: Struktur der Mitochondrien

(<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MathNat/Biologie/Didaktik/Zellatmung/dateien/mito/bilder/mtochondrium.gif>. 22.08.2009.)

Um in der Atmungskette Energie erzeugen zu können, werden Elektronen von NADH bzw. FADH_2 (Reduktionsäquivalente, die während der Glykolyse und im Citratzyklus entstanden sind) schrittweise auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die als Atmungskette bezeichnete Aneinanderreihung von Enzymkomplexen zeichnet sich durch ein sich stetig erhöhendes elektrochemisches Übertragungspotential aus. Zur Atmungskette gehören:

- Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase)
- Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase)
- Komplex III (Cytochrom c-Oxidoreduktase)
- Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase)
- Komplex V (F_1F_0 -Synthase oder ATP-Synthase)

Die Übertragung der Elektronen innerhalb der Enzymkomplexe ist (außer bei der Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase) an einen Transfer von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gekoppelt. Dabei wird die Energie umgesetzt, die bei der Elektronenübertragung von einem Komplex der Atmungskette auf den folgenden frei wird. Es entsteht somit ein Protonengradient über die innere Membran. Die Energie dieses Protonengradienten wird für die katalytische Bildung von ATP aus ADP durch die F_1F_0 -Synthase (ATP-Synthase) genutzt. Hierbei fließen Protonen durch einen Kanal im Enzym vom Intermembranraum in die

Matrix zurück. Der Prozess des Elektronentransports mit gekoppelter ATP-Synthese wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet (siehe Abb. 4; Saraste, 1999).

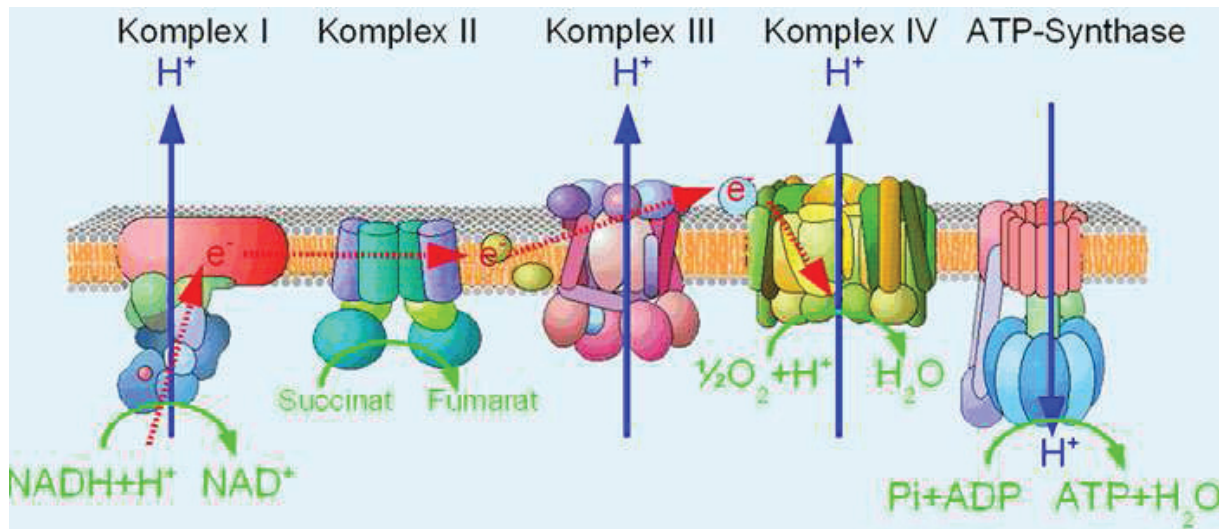


Abb. 4: Oxidative Phosphorylierung

(<http://www.uniduesseldorf.de/WWW/MathNat/Biologie/Didaktik/Zellatmung/bilder/atmungskettbeschr.jpg>, 22.08.2009.)

Die Regulation der oxidativen Phosphorylierung erfolgt über das Substratangebot. Sie kann nur ablaufen, wenn Reduktionsäquivalente, O_2 und ADP in ausreichender Menge vorhanden sind. Unter physiologischen Bedingungen ist das ADP-Angebot der Hauptregulator für die Atmungsgeschwindigkeit. Daneben sind einige Verbindungen, u.a. Rotenon, Antimycin A und CO, imstande, die Funktion der einzelnen Enzymkomplexe der Atmungskette spezifisch zu hemmen (Löffler, 2008). Des Weiteren kann NO zu den direkten Hemmstoffen der Zellatmung gezählt werden (Brown, 1995; Protti und Singer, 2007). Zurückfließende Protonen, die nicht zur ATP-Synthese genutzt werden, setzen die freie Enthalpie, die im Gradienten gespeichert ist, als Wärme frei. Die plurivakuolären Zellen des braunen Fettgewebes, das sich u.a. bei Winterschläfern und bei menschlichen Säuglingen (am Rücken und entlang der großen Gefäße) findet, nutzen diesen Mechanismus zur effektiven Wärmeerzeugung. Das verantwortliche Protonenkanalprotein ist das Thermogenin, auch UCP-1 (uncoupling protein 1) genannt. Die Funktion des Thermogenins besteht in der physiologischen Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Der durch Thermogenin gebildete Kanal in der inneren Mitochondrienmembran konkurriert dabei mit der F₁/F₀-ATPase um Protonen. Weitere physiologische Entkoppler sind das UCP-2, welches vor allem in Makrophagen, lymphoiden Zellen und pankreatischen Inselzellen vorkommt, sowie UCP-3, das in Skelettmuskelzellen exprimiert wird (Rousset et al., 2004). Die Funktion der physiologischen Entkoppler liegt vor allem in der Modulation des Stoffwechsels sowie der Limitierung des oxidativen Stresses.

1.3.2 Bedeutung für die Immunantwort

Das Konzept des gestörten zellulären Energiemetabolismus innerhalb des septischen Organversagens ist seit 40 Jahren bekannt (Carré und Singer, 2008), so wurden geschwollene und deformierte Mitochondria in Mäuselebern nach einer Endotoxininjektion beobachtet (Levy et al., 1968). Neue Erkenntnisse, dass die eingeschränkte mitochondriale Funktion auch unabhängig von einem ischämischen Insult zu beobachten ist (Rosser et al., 1998) und auch bei konstanter Perfusion die zelluläre Verarbeitung von Sauerstoff vermindert bleibt (Crouser et al., 2002; Porta et al., 2006), unterstützen folgende Hypothese: In dem Zustand der „cytopathic hypoxia“ resultiert der Zellschaden mehr aus der Unfähigkeit, den Sauerstoff zu nutzen als aus der fehlenden Verfügbarkeit desselben (Fink, 1997; Fink, 2000; Fink, 2001; Fink 2002). Aktuelle Studien besagen weiterhin, dass die mitochondriale Dysfunktion eine wichtige Rolle im sepsisinduziertem Organversagen spielt (Brealey et al., 2002; Brealey et al., 2004).

1.3.2.1 *Oxidativer Stress*

Etwa 1 – 4 % des Sauerstoffes werden während der Atmungskette in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt (Richter, 1988). Diese Enzym-katalysiert oder spontan ablaufenden Reaktionen können besonders bei Komplex I und Komplex IV beobachtet werden (Genova et al., 2003). ROS, wie Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikalanion ($OH^{\cdot-}$), entstehen als unvermeidbare Nebenprodukte der Energieproduktion durch die Interaktion von Sauerstoff und freien Elektronen (Muravchik und Levy, 2006). Obwohl sie unter physiologischen Bedingungen auch nützliche Effekte für den Organismus vermitteln (Barja, 1993), sind ROS äußerst reaktiv und imstande, nahezu alle Biomoleküle, wie Lipide, Proteine und DNA, zu schädigen (Bayir und Kagan, 2008). Um sich vor diesen Angriffen zu schützen, besitzen Zellen spezielle Abwehrmechanismen, die imstande sind, ROS zu neutralisieren. Durch die Superoxiddismutase und -katalase sowie die Glutathionperoxidase werden ROS wirkungsvoll enzymatisch eliminiert. Auch die antioxidativen Vitamine E und C stellen effektive Waffen gegen ROS dar (Löffler, 2008).

Unter den Bedingungen einer Sepsis kommt es durch Vermittlung von proinflammatorischen Mediatoren, wie IL-1 und TNF- α , zur verstärkten Bildung von ROS (Schulze-Osthoff et al.,

1992). In einem Sepsismodell wurde ein massiver Anstieg von ROS in Rattenhepatozyten beobachtet (Kantrow et al., 1997). Auch für NO, welches massiv in septischen Organismen ausgeschüttet wird (Evans et al., 1993; Escames et al., 2006), konnte eine Induktion der ROS-Produktion nachgewiesen werden. Dies scheint der Abwehr von eingedrungenen Mikroorganismen zu dienen (Cadenas und Cadenas, 2002). Die Schutzmechanismen der Zellen sind jedoch der Anflutung von ROS während einer Inflammationsreaktion nicht gewachsen; es kommt zur Ausbildung von oxidativem Stress (Exline und Crouser, 2008). In septischen Modellen konnte neben dem Anstieg an Oxidantien ein erniedrigtes Niveau von Antioxidantien, wie Gluthation, belegt werden (Keller et al., 1985; Fläring et al., 2003).

Die Mitochondrien sind nicht nur der Entstehungsort, sondern auch das Hauptangriffsziel von ROS. Im Zustand des oxidativen Stresses, z.B. während einer Sepsis, kommt es zur Schädigung von mitochondrialen Proteinen, was zu einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit der Zellorganellen führt (Crouser et al., 2002; Kroemer et al., 2007). Des Weiteren bewirkt NO eine direkte Hemmung der Atmungskette (Protti und Singer, 2007). Eine defekte Atmungskette begünstigt wiederum die Entstehung von ROS; es entsteht ein *circulus vitiosus* (Ozawa, 1997). Daneben verursachen ROS Schädigungen an der mitochondrialen DNA (Supinski und Callahan, 2006), was eine gestörte Biogenese der Zellorganellen nach sich zieht (Sulimann et al., 2003). Die daraus resultierende Störung des Energiemetabolismus mit inadäquater ATP-Synthese wird als „*cytopathic hypoxia*“ bezeichnet (Fink, 1997). Eine verminderte Aktivität der Atmungskette bei einem septischen Hintergrund wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Gellerich et al., 1999; Trumbeckaite et al., 2001; Gellerich et al., 2002; Crouser et al., 2002). Darüber hinaus konnte in septischen Tiermodellen ein erniedrigter ATP-Gehalt in verschiedenen Geweben gezeigt werden (Mela et al., 1971; Llesuy et al., 1994; Mizobata et al., 1995; Kantrow, 1997; Brealey et al., 2004). Muskelbiopsien von septischen Patienten wiesen ebenfalls verminderte ATP-Level auf (Brealey et al., 2002; Fredriksson et al., 2006). Ohne adäquaten Energiemetabolismus kann eine Zelle ihre Funktion nicht aufrechterhalten. Es kommt zum Zelltod mittels Apoptose oder Nekrose (Exline und Crouser, 2008). In einer Studie von *Brealey et al.* konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Gehalt an ATP im Gewebe und der Prognose von septischen Patienten nachgewiesen werden (Brealey et al., 2002).

1.3.2.2 *Autophagy, Apoptose und Nekrose*

Das Ausmaß des mitochondrialen Schadens und der daraus resultierende Energiestatus der Zelle beeinflusst die Art des Zelltodes (Lemasters et al., 2002; Kim et al., 2003). Die Apoptose ist ein energieabhängiger Prozess. Eine Zelle mit einem energiereichen Status unterläuft einem apoptotischen Zelltod, während ein Mangel an Energie mit einem nekrotischen Zelltod einhergeht (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997; Myoshi et al., 2006).

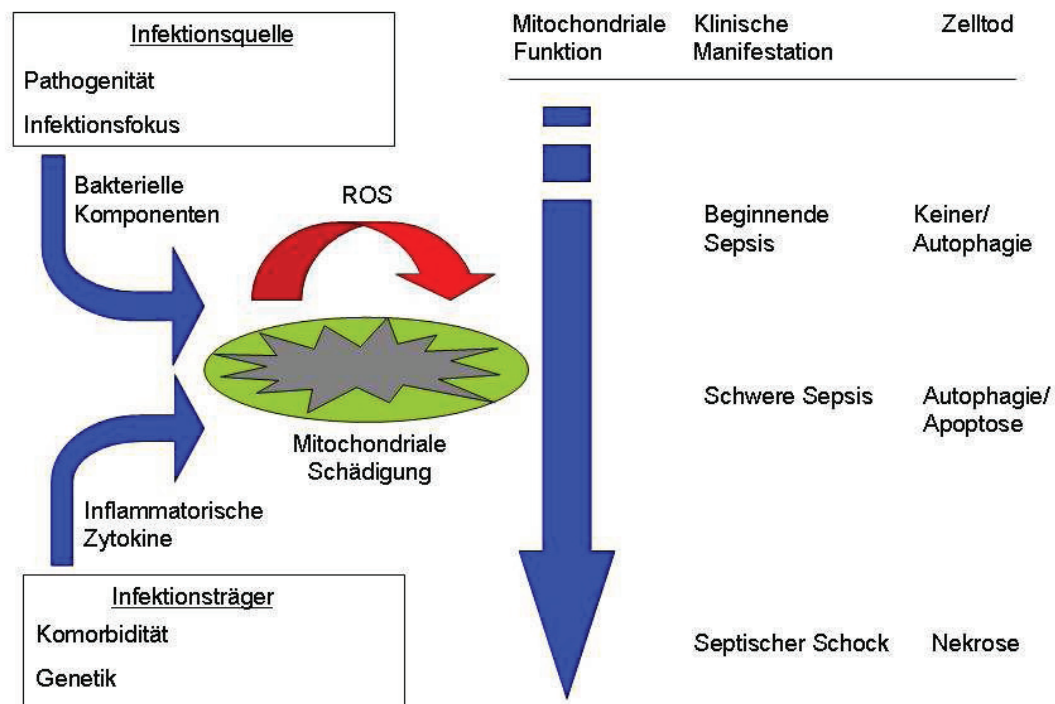


Abb. 5: Das Ausmaß der mitochondrialen Schädigung spiegelt sich in der Schwere der Sepsis wider. Verschiedene Faktoren des Infektionsträgers, wie Komorbidität oder die individuelle Genetik sowie die Charakteristik der Infektionsquelle sind bestimmende Größen für das Ausmaß der inflammatorischen Immunantwort. Das Ausmaß der mitochondrialen Schädigung sowie die Schwere der Sepsis steigern sich von einer beginnenden oder milden Sepsis (Infektion und systemische Inflammation ohne Organversagen) über eine schwere Sepsis (systemische Inflammation mit Organversagen) zum septischen Schock (systemische Inflammation mit Hypotension). Subletaler Zellstress kann zur selektiven Entfernung von irreparablen Mitochondrien führen. Überschreitet der Zellschaden ein bestimmtes Ausmaß, kommt es zur Auslösung der Apoptose. Unter extremen Bedingungen, wie sie im septischen Schock zu finden sind, ist die Schädigung der Mitochondrien derart massiv, dass es über die akute ATP-Depletion zur Zellyse mittels Nekrose kommt. (modifiziert nach Exline und Crouser, 2008).

Wird ein Mitochondrium geschädigt, erfolgt zunächst der Ausschluss vom Energiemetabolismus der Zelle („off-line“). Mittels Autophagy wird von der Zelle ein Versuch zur Erneuerung der Organelle unternommen. Gelingt dies nicht, kann die Mitoptosis, der programmierte

Tod des Mitochondriums, eingeleitet werden (Gellerich et al., 2002). Steigt in einer Zelle die Zahl der beschädigten Mitochondrien auf ein bestimmtes Niveau an, kommt es zur Induktion von Apoptose. Unter extremen Bedingungen, wie z. B. Hitzeschock oder der Gabe von hochdosiertem Endotoxin, ist die Schädigung der Mitochondrien so akut und ausgeprägt, dass ein nekrotischer Zelltod resultiert (Exline und Crouser, 2008). Übersteigt der Zellverlust in einem Gewebe eine kritische Masse, entwickelt sich daraus das Organversagen (Bauer et al., 2004).

Die zelluläre Apoptose umfasst eine Serie von gut koordinierten und strikt kontrollierten Prozessen. Aus der Bindung von Liganden an spezielle Todesrezeptoren oder zytotoxischen Schädigungen resultiert die Aktivierung von verschiedenen Proteasen und anderen hydrolytischen Enzymen, die zur Proteolyse, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation führen (Orrenius et al., 2007). Für die Zellapoptose kann sowohl ein extrinsischer als auch ein intrinsischer Aktivierungsweg mit mitochondrialer Beteiligung beschrieben werden (Susin et al., 1999), wobei beide Wege in der Sepsis von Bedeutung sind (Chang et al., 2007). Bei der extrinsischen Aktivierung binden Signalstoffe, wie z.B. Zytokine, TNF- α , Fas-Ligand oder Glukokortikoide, an spezifische Rezeptoren und starten eine intrazelluläre Signalkaskade, die zur Aktivierung der Caspase-8 führt (Oberholzer et al., 2001). Caspase-8 aktiviert wiederum Effektorcaspasen, die die terminalen Schritte zum Zelltod einleiten (Lakhani et al., 2006). Der intrinsische Aktivierungsweg ist die Antwort auf einen irreversiblen Zellschaden, wie z. B. ionisierende Strahlung oder Schädigungen durch ROS (Wang, 2001). Das zentrale Ereignis der intrinsischen Aktivierung der Apoptose ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, auch „mitochondrial outer membrane permeabilization“ (MOMP) genannt (Green und Kroemer, 2004). Zwei verschiedene Vorgänge haben die Ausbildung von MOMP zur Folge. Zum einen kommt es durch die Wechselwirkung von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie (u.a. Bax und Bak) mit der äußeren Mitochondrienmembran zur gesteigerten Membrandurchlässigkeit (Scorrano und Korsmeier, 2003; Burlacu, 2003). Alternativ dazu kann eine gesteigerte Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran (mitochondrial permeability transition, MPT) zur Schwellung der Matrix und zur sekundären Ruptur der äußeren Membran führen (Green und Kroemer, 2004). Die durch beide Mechanismen resultierende Membranpermeabilisierung führt zur Freisetzung der pro-apoptotischen Proteine Cytochrom c und Procaspase-9 aus dem Intermembranraum in das Zytosol (Susin et al., 1998; Lakhani et al., 2003). Durch die Organisation dieser Proteine mit dem Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) und dem Cofaktor ATP zum Apoptosom kommt es zur Aktivierung der Effektorcaspasen, die den letzten Schritt der Apoptose einleiten

(Bao und Shi, 2007). Als Verknüpfung zwischen extrinsischem und intrinsischem Aktivierungsweg fungiert das Protein Bid aus der Bcl-2 Familie, das während einer extrinsischen Aktivierung eine verstärkte Freisetzung von pro-apoptotischen Mediatoren aus dem Intermembranraum vermittelt (Scaffidi et al., 1998; Medema et al., 1998).

Ist die Schädigung der Mitochondrien einer Zelle so massiv, dass die Energieproduktion nicht mehr aufrechterhalten werden kann, so resultiert daraus eine akute ATP-Depletion. Folge dieser bioenergetischen Katastrophe ist der unkontrollierte Zelltod durch Nekrose (Exline und Crouser, 2008). Durch die frühe Zerstörung der Zellmembran und das Austreten von Zellmaterial in das umliegende Gewebe entsteht ein neuer Inflammationsherd (Kroemer et al., 1998).

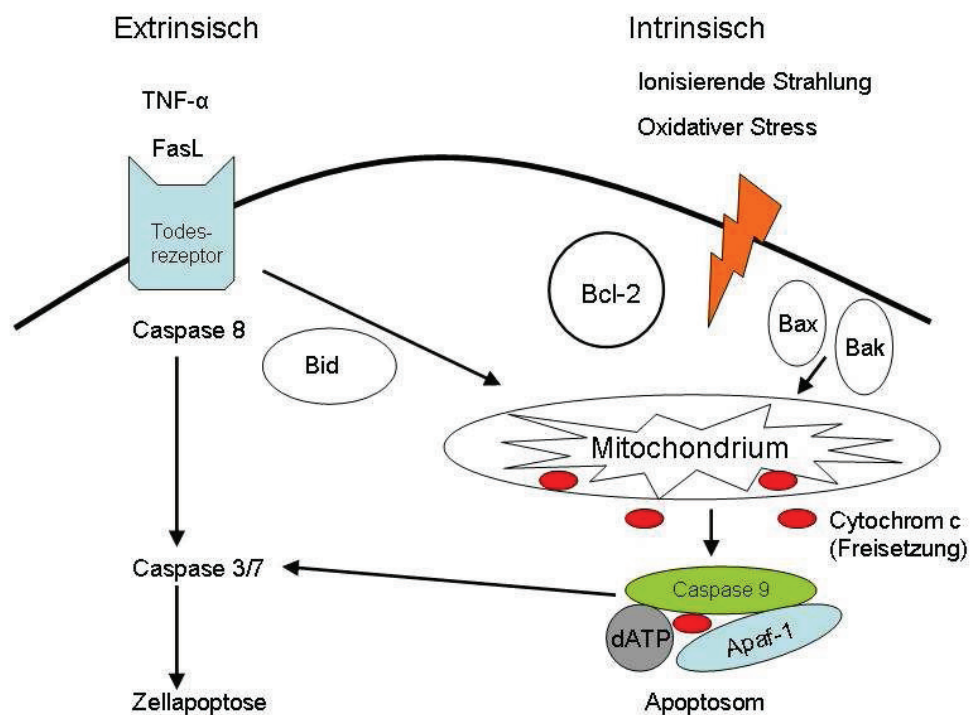


Abb. 6: Signalübertragung der Apoptose. Der extrinsische Aktivierungsweg startet mit einem extrazellulären Todessignal der „tumor necrosis factor superfamily“, z.B. TNF- α oder Fas-Ligand (FasL), an ihre entsprechenden Rezeptoren. Die durch den Rezeptor aktivierte Caspase 8 aktiviert wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7, die zur Zellapoptose führen. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von Bid, das die mitochondriale Signalkaskade mit einbezieht. Der intrinsische Aktivierungsweg beginnt mit einer Zellschädigung, z.B. durch ROS. Die durch die Proteine Bax und Bak (äußere Membran) oder mitochondrial permeability transition /MPT (innere Membran) vermittelte Membrandurchlässigkeit führt zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem Intermembranraum. Cytochrom c, Caspase 9, „apoptotic protease-activating factor“ (Apaf-1) und der Cofaktor ATP bilden das Apoptosom, welches wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7 aktivieren kann (modifiziert nach Exline und Crouser, 2008).

Alles in allem ist die Beteiligung der Mitochondrien bei der Aktivierung und Regulierung des Zelltodes sehr komplex und noch nicht gänzlich verstanden. Als Vermittler zwischen Leben und Tod ist ihr Einfluss auf das Entstehen des septischen Organversagens gesichert. Im Rahmen der immer mehr an Bedeutung gewinnenden „Mitochondrialen Medizin“ (Larsson and Luft, 1999) könnte ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der mitochondrialen Dysfunktion während einer Sepsis neue Therapieansätze bieten.

1.3.3 Das mitochondriale Gen ATP8

Die mitochondriale DNA (mtDNA) von Säugetieren ist ein zirkuläres Molekül, das sich in Kopien zu tausenden in einer Zelle befindet (Clayton, 1992). Mit der Entdeckung der mitochondrialen DNA im Jahre 1963 durch Nass und Nass (Nass und Nass, 1963) wurde ein neues Forschungsfeld erschlossen. 1981 folgte die Veröffentlichung der kompletten Sequenzen von Maus- (Bibb et al., 1981) und Human-mtDNA (Anderson et al., 1981). Die mtDNA kodiert für 13 mRNAs, 22 tRNAs und zwei rRNAs. Alle 13 Proteine, die durch mtDNA kodiert werden, sind Schlüsselkomponenten der Atmungskette. Die große Mehrheit der über 1000 mitochondrialen Proteine werden allerdings im Zellkern kodiert (Larsson und Luft, 1999).

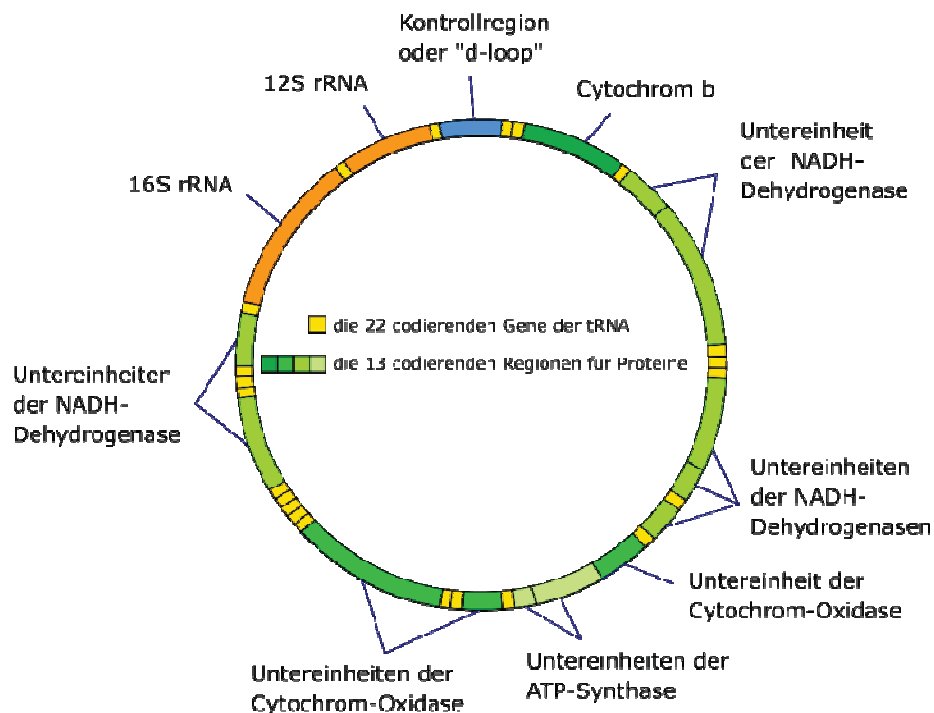


Abb. 7: Schematische Darstellung der mitochondrialen DNA. Die NADH-Dehydrogenase entspricht der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, die Cytochrom-Oxidase der Cytochrom c-Oxidase.

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0a/Mitochondrial_DNA_de.svg/400px-Mitochondrial_DNA_de.svg.png. 22.08.2009.)

Das Gen ATP8 wird durch mtDNA kodiert; sein Produkt ist als Untereinheit A6L (oder 8) Bestandteil der ATP-Synthase bzw. des Komplex V der Atmungskette (Anderson et al., 1981). Die ATP-Synthase ist ein Komplex mit vielen Untereinheiten und gliedert sich in zwei funktionelle Domänen, die F₁- und die F₀-Domäne (siehe Abb. 8). Den katalytischen Teil des Enzyms bildet die F₁-Domäne, die sich in der mitochondrialen Matrix befindet. Die F₀-Domäne ist in die innere mitochondriale Membran eingebettet und funktioniert als Protonenkanal

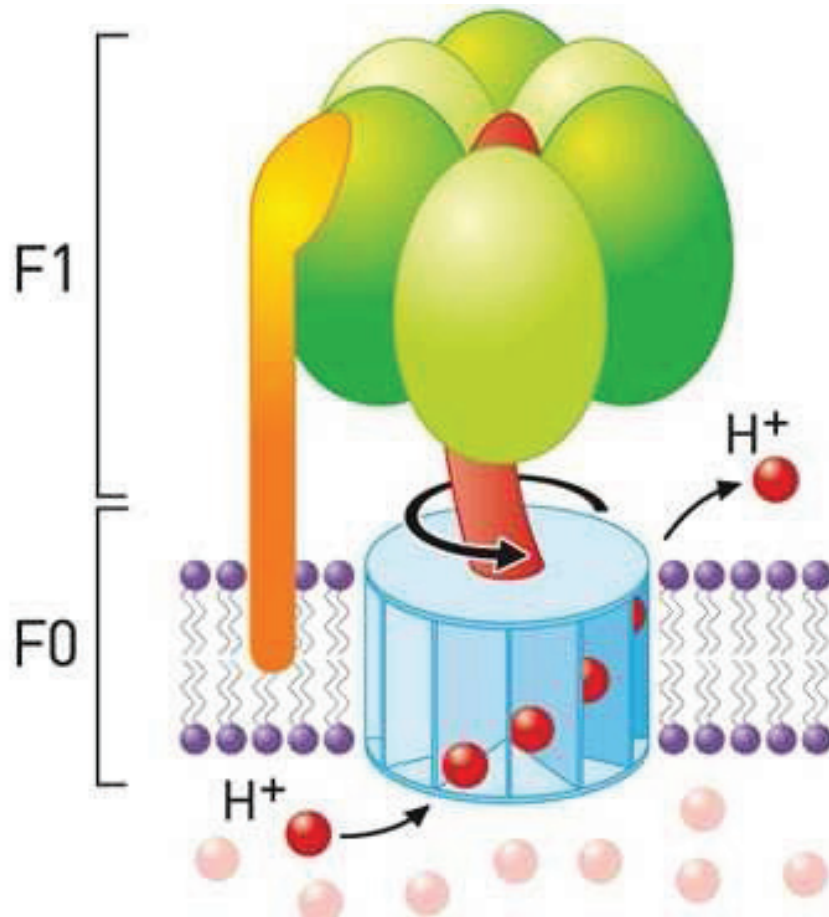


Abb. 8: Schematische Darstellung der ATP-Synthase.

(<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/makeatp/ATP.synthase.schulten.jpg>. 22.08.2009.)

Beide Domänen setzen sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen. Der F₁-Sektor besteht aus je drei α - und β -Untereinheiten und jeweils einer γ -, δ - und ϵ -Untereinheit. Die F₁-Untereinheiten γ , δ - und ϵ bilden den zentralen Stiel der mitochondrialen ATP-Synthase. Der F₀-Sektor besteht aus einem Ring, der aus 10 Kopien der Untereinheit c aufgebaut ist. Dazu kommen jeweils eine Untereinheit a, b, d, h (oder F₆) und OSCP. Die Untereinheiten b, d, h (oder F₆) und OSCP bilden den peripheren Stiel, der sich an der Seite der ATP-Synthase befindet (siehe Abb. 9). Zusätzliche Untereinheiten der F₀-Domäne werden durch die Bereiche e, f, g, i/j, k und A6L (oder 8) repräsentiert. Eine genaue Lokalisation dieser Untereinheiten

ist bisher noch nicht gelungen (Nijtmans et al., 1995; Devenish et al., 2008). Die Bedeutung der Untereinheit 8 konnte noch nicht geklärt werden. In Hefepilzen wurde gezeigt, dass beim Fehlen der Untereinheit 8 auch die Untereinheit 6 nicht in den Enzymkomplex integriert werden kann, was ein funktionsloses Enzym zur Folge hat (Hadikusumo et al., 1988). Es wird vermutet, dass sich die Untereinheit 8 in der ATP-Synthase von Hefepilzen proximal von verschiedenen anderen Untereinheiten im peripheren Stiel befindet (Stephens et al., 2000; Stephens et al., 2003). Höchstwahrscheinlich liegt die Bedeutung der Untereinheit 8 in der Bildung eines Teils des zur Stabilisierung dienenden peripheren Stiels (Bateson et al., 1999). Sowohl die beiden Domänen der ATP-Synthase als auch die zwei sie verbindenden Stiele sind mit Hilfe der Elektronenmikroskopie klar zu erkennen (Rubinstein et al., 2003).

Die Synthese von ATP durch die ATP-Synthase ist an zwei rotierende Motoren gekoppelt. Durch den aus der F_0 -Domäne gebildeten Tunnel gelangen Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix. Die dadurch frei werdende Energie ermöglicht eine Rotation des c-Rings und der Untereinheiten γ -, δ - und ϵ in Bezug auf die Untereinheit a. Die Rotation der γ -Untereinheit vermittelt so die Energie für die ATP-Synthese (Boyer, 1997; Noji et al., 1997; Nishio et al., 2002).

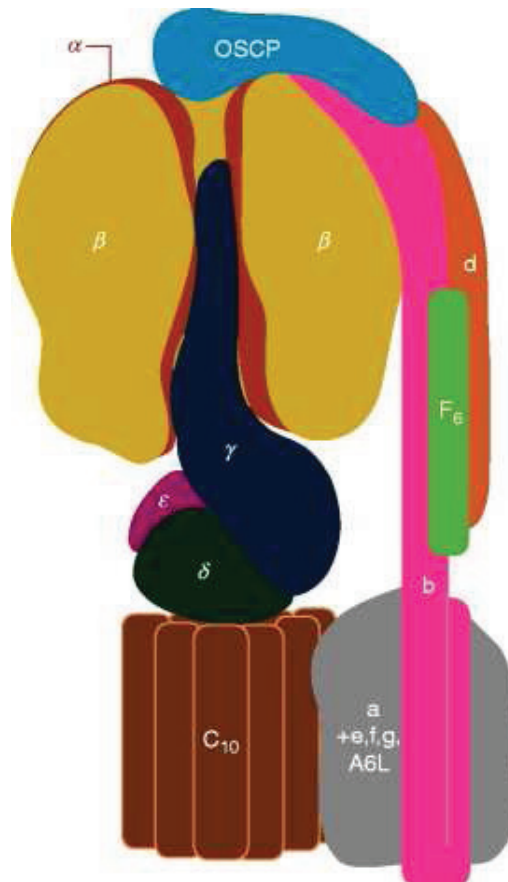


Abb. 9: Aufbau der ATP-Synthase. Das Protein A6L (oder 8), das durch das Gen ATP8 kodiert wird, befindet sich vermutlich im unteren Anteil des peripheren Stiels (Devenish et al., 2008).

Neben der Untereinheit A6L (oder 8) wird auch die Untereinheit a (oder 6) von mtDNA (Gene ATP8 bzw. ATP6) kodiert (Anderson et al., 1981). Eine Funktionseinschränkung der ATP-Synthase kann auf Mutationen der nuklearen oder mitochondrialen DNA zurückgeführt werden (Sperl et al., 2006; De Meirleir et al., 2004). Mutationen von mtDNA kodierten Proteinen der ATP-Synthase betreffen fast ausschließlich ATP6. So konnten Punktmutationen des ATP6 Gens beschrieben werden, die zum klinischen Bild des NARP-Syndroms (Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa) führen. Des Weiteren wird das maternal vererbte Leigh Syndrom (MILS) durch Mutationen des ATP6 Gens verursacht (Sperl et al., 2006; Morava et al., 2006). Die einzig bisher bekannte Mutation des ATP8 Gens im Menschen entdeckten *Jonckheere et al.* 2008 bei einem Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie und Neuropathie (Jonckheere et al., 2008).

2 ZIEL DER ARBEIT

Ziel dieser experimentellen Studie war es zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß die Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 die Entwicklung des akuten septischen Leberversagens innerhalb eines etablierten Mausmodells beeinflusst. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnte *in vivo* analysiert werden, welche Bedeutung die Genexistenz auf die Entwicklung der durch Endotoxin verursachten Mikrozirkulationsstörungen und Parenchymschäden einnimmt. Zusätzlich wurden histologische, immunhistochemische, laborchemische und molekularbiologische Analyseverfahren angewendet, um die Untersuchungen zu vervollständigen und die *in vivo* Ergebnisse zu verifizieren.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Ist die ATP8-Mutation bei der Ausprägung der Inflammationsreaktion, die aus der D-GalN/LPS-Applikation resultiert, von Bedeutung? Wenn ja, in welchem Maß kann ein Einfluss beobachtet werden?
2. Beeinflusst die ATP8-Mutation die hepatische Mikrozirkulation, welche im Modell der D-GalN/LPS-Applikation stark eingeschränkt ist?
3. Welche Bedeutung kann dem Gen ATP8, welches für eine Untereinheit der ATP-Synthase kodiert, im hepatischen Energiemetabolismus beigemessen werden? Erfolgt durch die Genmutation eine Modulation des Energiestatus der Hepatozyten? Wenn ja, welchen Einfluss hat der veränderte Energiestatus auf die Entwicklung des akuten Leberversagens?
4. Inwieweit kann ein Einfluss der Mutation des ATP8 Gens auf die Ausbildung der hepatischen Apoptose und/oder der Nekrose beobachtet werden, welche als Hauptursache für die Entstehung des akuten Leberversagens bekannt sind?
5. Wirkt sich die ATP8-Mutation auf die Mortalität der Versuchstiere als Folge des akuten septischen Leberversagens aus?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Mäuse des „conplastic strain“ C57BL/6J- $\text{mt}^{\text{FVB/N}}$ verwendet. Diese Tiere sind bei einem C57BL/6J-Hintergrund des Weiteren Träger der mitochondrialen DNA des FVB/N-Stamms, welche eine Mutation in der Untereinheit 8 der ATP-Synthase aufweist. (Yu et al., 2009; Gimsa et al., 2009). Bei dieser Mutation wird Guanin durch Thymin in der mitochondrialen DNA ersetzt (nt7778 G \rightarrow T), woraus ein Austausch der Aminosäure Asparagin durch Tyrosin im Protein resultiert (Gimsa et al., 2009).

Die Mausstämme C57BL/6J und FVB/N stammen aus der Zucht von der Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Um „conplastic strains“ zu erzeugen, wurde ein weibliches Tier des FVB/N-Stamms mit einem männlichen Tier des C57BL/6J-Stamms gekreuzt und anschließend der weibliche Nachkomme mit einem C57BL/6J für zehn folgende Generationen zurück gekreuzt. Der Nachkomme der zehnten Generation wurde als „conplastic strain“ C57BL/6J- $\text{mt}^{\text{FVB/N}}$ angesehen, der das nukleäre Genom des C57BL/6J-Stamms sowie das mitochondriale Genom des FVB/N-Stamms trägt (Gimsa et al., 2009). Für die Versuche wurden acht bis zwölf Wochen alte männliche Tiere verwendet, die vor Beginn der Experimente für einige Tage in einem klimatisiertem Raum (Temperatur 22 - 24°C, Luftfeuchtigkeit ca. 60 %) in einem jeweils 12 Stunden dauerndem Hell-Dunkel-Zyklus gehalten wurden. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz und der Nutzerordnung für die Zentrale Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt.

3.2 Modell

3.2.1 Modell zum Studium des akuten septischen Leberversagens

Zur experimentellen Untersuchung des akuten septischen Leberversagens wurden die Versuchstiere mit einer Kombination aus D-Galactosamin (D-GalN) und Lipopolysaccharid (LPS) vorbehandelt, welches ein weit verbreitetes Modell zur Leberschädigung darstellt.

3.2.1.1 *D-Galactosamin*

Der Aminosucker D-Galactosamin (D-GalN) wird ausschließlich in der Leber metabolisiert und dient der Sensibilisierung gegenüber Lipopolysaccharid (LPS). Die alleinige Gabe von D-GalN wirkt kaum toxisch, jedoch werden die Effekte von LPS in Ratten, Mäusen und Kaninchen durch die zusätzliche Applikation von D-GalN tausendfach verstärkt (Galanos et al., 1979; Freudenberg et al., 1986). Etwa 30 Minuten nach Injektion führt D-GalN mittels selektiver Depletion von Uridinnukleotiden zu einer schweren Transkriptions- und Translationshemmung, deren Folge die gesteigerte LPS-Empfindlichkeit ist (Leist et al., 1995).

3.2.1.2 *Lipopolysaccharid*

Das Endotoxin LPS befindet sich auf der Oberfläche von gram-negativen Bakterien. Durch die vermittelte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- α , ist LPS an der Entwicklung des septischen Leberversagens und des septischen Multiorganversagens beteiligt (Bohlinger et al., 1996). LPS, ein hitzestabiles, amphiphiles Glykoprotein, besteht aus einem hydrophoben Lipidanteil (sog. Lipid A) und einer kovalent gebundenen hydrophilen Polysaccharidregion. Für die Stimulation des Immunsystems ist vor allem die Lipid A Region von Bedeutung (Alexander et al., 2001).

Zur Induktion des Leberversagens wurde den Versuchstieren eine Kombination aus 720 mg/kg Körpergewicht (KG) D-GalN (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 10 μ g/kg KG LPS (*Escherichia coli* Serotyp 0128:B12, Sigma-Aldrich), gelöst in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung, intraperitoneal injiziert. Die verwendeten Konzentrationen von D-GalN und LPS wurden entsprechend bereits veröffentlichten Arbeiten gewählt (Leist et al., 1995; Morikawa et al., 1996; Klintmann et al., 2004). Kontrolltiere erhielten gleiche Volumina physiologische Kochsalzlösung in Bezug auf das KG intraperitoneal verabreicht.

3.2.2 **Anästhesie und chirurgische Präparation**

Vor Durchführung der Experimente erfolgte die Anästhesie der Versuchstiere mittels intraperitonealer (ip.) Injektion einer Kombination aus 75 mg/KG Ketamin (Betapharm GmbH &

Co. KG, Vechta, Deutschland) und 25 mg/KG Xylazin (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Bayer HealthCare, Deutschland). Nach Entfernung der Haare an Hals und Bauch durch Elektrorasur (AESCULAP® Favorita II, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch mit integrierter Heizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) fixiert. Hierdurch wurde die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur zwischen 36°C und 37°C während des gesamten Versuchszeitraums ermöglicht.

Nach paratrachealer Längsinzision erfolgte unter Verwendung eines Stereomikroskops (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) zur Blickfeldvergrößerung die Darstellung der linken Vena jugularis externa. Das Gefäß erhielt eine proximale Ligatur (Polyester-S grün USP 5/5, nicht resorbierbar, Markneukirchen, Deutschland), woraufhin über eine distale Längsinzision ein Polyethylenkatheter intraluminal eingeführt werden konnte. Der Katheter (PE50, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm, Smiths Medical International Ltd., Kent, England) wurde mittels vorher gelegter Ligatur am Gefäß fixiert und diente der Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen und Narkosemittel im späteren Versuchsverlauf. Die mediane Laparotomie erfolgte bei gleichzeitiger Blutstillung mittels Thermokoagulation. Um den Zugang zur Leber zu erleichtern, erfolgte zusätzlich eine transversale Laparotomie. Für eine verbesserte Übersicht im Operationsfeld erfolgte die Fixierung der oberen Bauchwand in kranialer Richtung. Zur Mobilisierung des linken Leberlappens wurden die Haltebänder der Leber zum Zwerchfell, zum Magen und zum Retroperitoneum durchtrennt. Der linke Leberlappen wurde nun mit Hilfe von feuchten Wattestäbchen rotiert, sodass die vormals nach innen zeigende Oberfläche sichtbar wurde. Das Drehen und die anschließende Auslagerung des linken Leberlappens auf ein in optimale Position und Form gebrachtes Plastilinbett mussten mit großer Sorgfalt erfolgen, da kleinste Gewebeschäden die Versuche beeinträchtigt hätten. Die anatomisch dorsale (jetzt nach oben gerichtete) Oberfläche des ausgelagerten linken Leberlappens wurde mit einem Deckgläschen (12 mm Durchmesser) bedeckt und mit warmer Kochsalzlösung umspült, um die nun folgende Intravitalmikroskopie zu ermöglichen. Die verbleibende Leberoberfläche wurde mit einer Sauerstoff-impermeablen Folie bedeckt, um sie gegen Austrocknung und vor der Exposition gegenüber atmosphärischem Sauerstoff zu schützen. Um die übrigen Abdominalorgane feucht zu halten, erfolgte deren Abdeckung mit einer in warmer Kochsalzlösung getränkten Kompresse. Im weiteren Verlauf des Versuches wurde die Feuchthaltung in regelmäßigen Abständen kontrolliert und ggf. erneut Kochsalzlösung aufgetragen.

3.3 Untersuchungstechniken

3.3.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) ist die Methode der Wahl bei der Visualisierung der hepatischen Mikrozirkulation. Neben der Darstellung der Hepatozytenmorphologie ist es mit Hilfe des IVM zudem möglich, Veränderungen der hepatischen Perfusion, der Leukozytenakkumulation sowie der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu beobachten (Menger et al., 1991; Vollmar und Menger 1998; Menger et al., 1999).

3.3.1.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht) ist bei bestimmten Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge beobachtbar. Dieser Vorgang ist eine Form der Lumineszenz und wird als Fluoreszenz bezeichnet. Bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle (Fluorophore) absorbieren hierbei die Photonen und gelangen dadurch von ihrem stabilen Grundzustand (S_0) auf ein höheres Energieniveau (S_1). Die Elektronen können sich jedoch nicht auf diesem Niveau halten und fallen deshalb praktisch augenblicklich (ca. 10^{-12} s) auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei setzen sie die aufgenommene Energie wieder frei und es kommt zur Emission des Fluoreszenzlichts. Allerdings wird die Energie nicht nur als Licht freigesetzt. Deshalb ist das emittierte Licht etwas energieärmer als das Anregungslicht (Stokes-Verschiebung). Energieärmere Lichtstrahlung besitzt jedoch eine größere Wellenlänge und deshalb auch eine andere Lichtfarbe als energiereichere Lichtstrahlung. Das emittierte Fluoreszenzlicht besitzt oft eine um etwa 20 - 50 nm größere Wellenlänge als das Anregungslicht. Diese Differenz in der Wellenlänge zwischen den beiden Lichtarten wird als Stokes-Differenz bezeichnet. Aufgrund dieser Besonderheit ist es möglich, die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Epi-Illuminationstechnik als sogenannte Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie zu verwenden. Hierbei wird das Licht einer bestimmten Wellenlänge nach Passage des Anregungsfilters durch einen dichromatischen Teilerspiegel auf das Präparat gelenkt, während nur das vom Präparat emittierte, langwelligere Licht die Optik zum Okular passieren kann. Ein zusätzlicher Emissionsfilter sorgt dafür, dass nur der für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifische Wellenlängenbereich im Abbildungsstrahlengang erscheint (siehe Abb. 10).

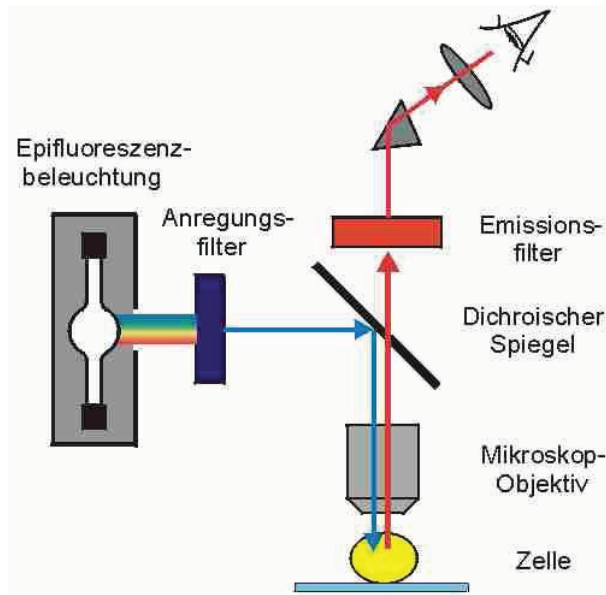


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.
(<http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/epifluol.jpg>. 21.08.2009.)

3.3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Um die Mikrozirkulation der Leber *in vivo* untersuchen zu können, wurden in dieser Studie zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. **Natriumfluoreszein** ($C_2H_{10}Na_2O_5$) ist aufgrund der Fenestrierung des Leberendothels in der Lage, nach intravasaler Applikation in den Extravasalraum zu diffundieren. Die Aufnahme des Farbstoffes, vor allem durch perizentral gelegene Hepatozyten, führt zur Akkumulation von Natriumfluoreszein im Zytoplasma. Die anschließende Beleuchtung mit blauem Licht (Wellenlänge 450 - 490 nm) regt den in Hepatozyten akkumulierten Farbstoff zur Fluoreszenz an, woraufhin es zur Emission von Licht mit einer größeren Wellenlänge (530-540 nm) kommt. Die dadurch erreichte Kontrastverstärkung zwischen den Lebersinusoiden (dunkel) und Hepatozyten (hell) ermöglicht die *in vivo* Untersuchung der Perfusion innerhalb der hepatischen Sinusoide.

Die Fähigkeit des Fluoreszenzfarbstoff **Rhodamin 6G** ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$) in Leukozytenmitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotential zu akkumulieren ermöglicht eine *in vivo* Kontrastierung der Leukozyten. Nach der intravasalen Injektion und der anschließenden Beleuchtung mit grünem Anregungslicht (Wellenlänge 530-560 nm) folgt die Emission des Fluoreszenzlichts (Wellenlänge > 580 nm) durch die Leukozyten. Die nun gut abgrenzbaren Blutzellen ermöglichen eine Analyse ihres Fließverhaltens sowohl in Sinusoiden als auch in postsinusoidalen Venolen.

3.3.1.3 Konfiguration und Versuchsdurchführung

Für die Versuche dieser Studie wurde ein Zeiss Fluoreszenzmikroskop verwendet, welches mit einer 100 W Quecksilberdampflampe und verschiedenen Filtern für blaues, grünes und ultraviolettes Anregungslicht sowie einem Wasser-Immersionsobjektiv (x20/0.50W, Zeiss) ausgestattet ist (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland). Alle Bilder wurden mittels einer charge-coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990/AIQ, Pieper, Berlin, Deutschland) visualisiert und durch einen VHS Videorekorder (Fuji magnetic GmbH, Kleve, Deutschland) aufgezeichnet, um die Daten zu einem späteren Zeitpunkt nach Digitalisierung auszuwerten (Eipel et al., 2004; Eipel et al., 2005). Um eine präzise Analyse der Daten zu gewährleisten, wurde während der Aufnahmen ein Videozeitgenerator in das Bild projiziert.

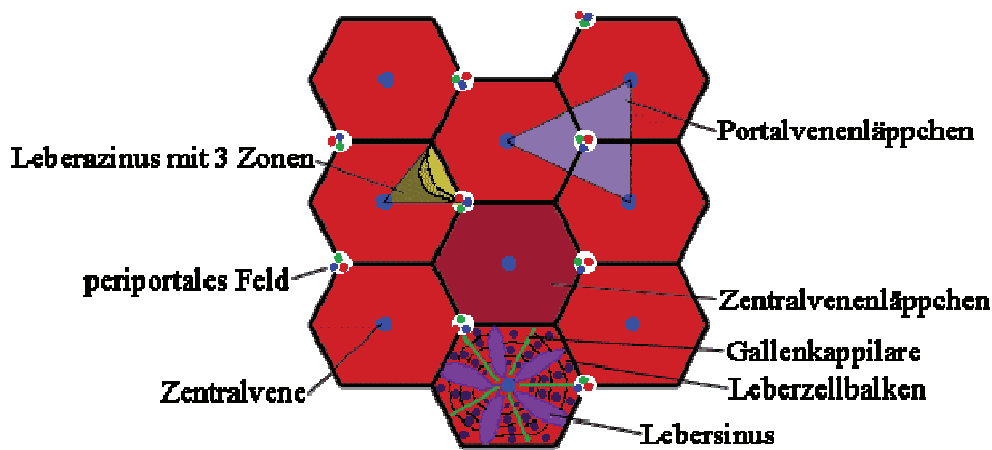


Abb. 11: Aufbau und Einteilung der hepatischen Mikrostruktur.
(<http://www.tobias-schwarz.net/medizin/spezielle/leber.gif>. 22.08.2009.)

Zur Untersuchung der hepatischen sinusoidalen Perfusion erfolgte eine Kontrastverstärkung des Gewebes durch die Applikation von Natriumfluoreszein unter Verwendung des V. Jugularis-Katheters (2 $\mu\text{mol/kg}$ KG; Merck, Darmstadt, Deutschland). Um das Fließverhalten der Leukozyten studieren zu können, erfolgte die Applikation des Farbstoffes Rhodamin 6G (1 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht; Merck, Darmstadt, Deutschland). Bei jedem Versuchstier wurden jeweils zehn Leberazini mit gut beurteilbaren Sinusoiden für 20 Sekunden sowie zehn Leberazini mit gut sichtbaren postsinusoidalen Venolen für 40 Sekunden aufgezeichnet (Eipel et al. 2004).

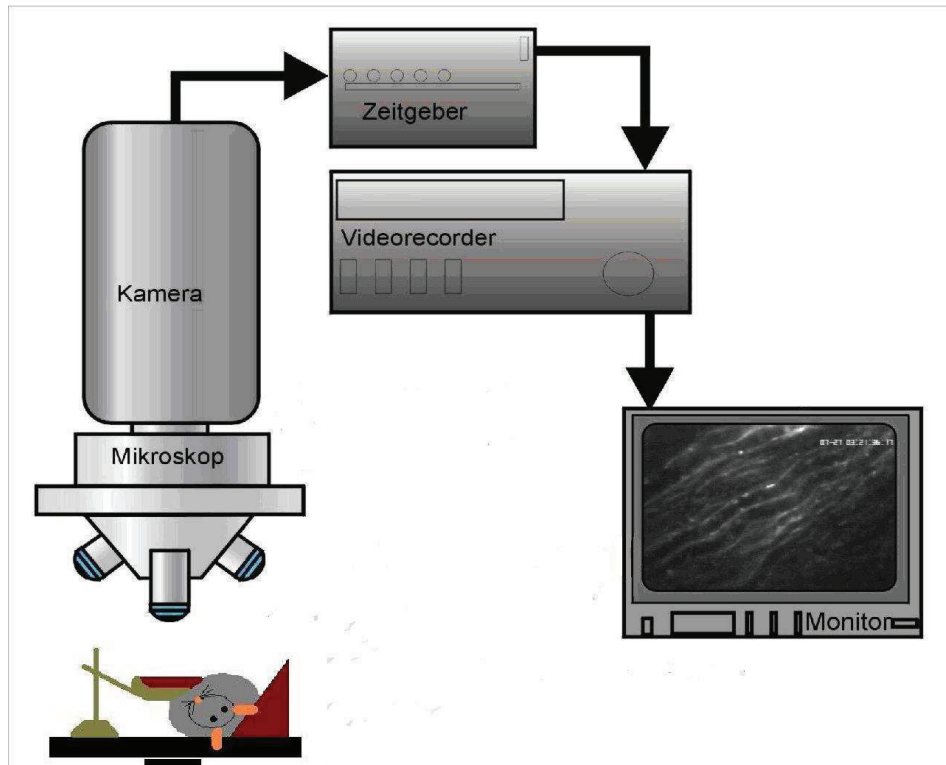


Abb. 12: Schematischer Versuchsaufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die hepatische Mikrozirkulation wurde mit Hilfe einer CCD-Videokamera auf einem Monitor visualisiert und gleichzeitig auf Videobänder aufgezeichnet. Der ins entstehende Bild eingeblendete Zeitgeber ermöglichte die exakte Analyse der Daten mit einem digitalen Bildanalysestems (CapImage) zu einem späteren Zeitpunkt.

3.3.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Die während der Versuche mit dem IVM angefertigten Videoaufnahmen wurden zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe eines digitalen Bildanalysestems (CapImage; Zeintl, Heidelberg, Deutschland) und Visualisierung auf einem 19'' Monitor ausgewertet. Die quantitativen Analysen der mikrozirkulatorischen Parameter wurden bei 424-facher Vergrößerung durchgeführt. Für jeden Parameter eines Versuchstieres wurden zehn Gesichtsfelder analysiert und die entsprechenden Ergebnisse festgehalten.

3.3.2.1 *Hepatische sinusoidale Perfusion*

Zur Analyse der hepatischen sinusoidalen Perfusion wurde eine 200 μm lange Linie midzonal im rechten Winkel zum Verlauf der Sinusoide in das Analysebild projiziert. Jetzt erfolgte die Auszählung der die Analyselinie kreuzenden perfundierten Sinusoide und derer, die über den

Zeitraum von 20 Sekunden nicht perfundiert wurden. Der prozentuale Anteil der perfundierten Sinusoide wurde anschließend als Parameter für die hepatische sinusoidale Perfusion verwendet.

3.3.2.2 Venuläres Leukozyten-Rolling und venuläre Leukozytenadhärenz

Für die Analyse wurden gut sichtbare Abschnitte der Venolen vermessen (Länge l in μm , Durchmesser d in μm), um unter Annahme einer zylindrischen Geometrie die Endotheloberfläche (A) des untersuchten Gefäßabschnittes berechnen zu können:

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

Nachfolgend wurden adhärenente Leukozyten gezählt, die sich für 20 Sekunden im definierten Gefäßabschnitt befanden und an dieser Stelle verharren. Die so ermittelte venuläre Leukozytenadhärenz wird in der Einheit n/mm^2 angegeben.

Bewegen sich Leukozyten entlang von postsinusoidalen Venolen mit einer Geschwindigkeit, die weniger als zwei Fünftel der Fließgeschwindigkeit der Zellen in der Mittellinie des Gefäßes (Zentralstromgeschwindigkeit) beträgt, wird dies als „Leukozyten-Rolling“ bezeichnet (Vollmar et al., 2002). Zur Analyse wurden zum einen alle frei passierenden und zum anderen alle „rollenden“ Leukozyten gezählt, die den definierten Gefäßbereich während eines Zeitraums von 15 Sekunden durchquerten. Als Parameter für das venuläre Leukozyten-Rolling wurde der prozentuale Anteil der rollenden zu allen sich bewegenden Leukozyten verwendet.

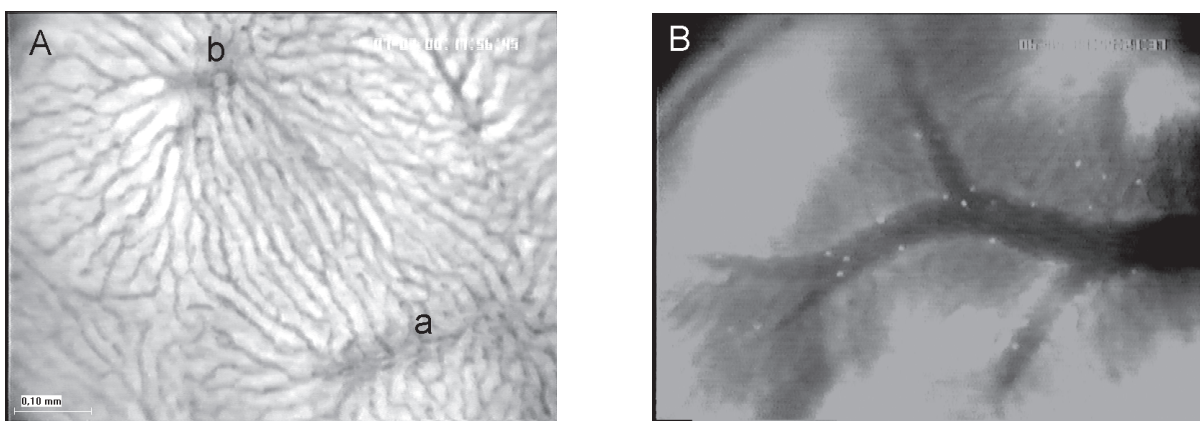


Abb. 13: Repräsentative Bilder der hepatischen Mikrozirkulation. Abb. A zeigt eine Aufnahme der hepatischen sinusoidalen Perfusion unter Blaulicht-Epiillumination und nach Gabe von Natriumfluoreszein, wobei a ein periportales und b ein perizentrales Areal markiert. Abb. B zeigt eine postsinusoidale Venole unter Grünlicht-Epiillumination und nach Gabe von Rhodamin 6G. Leukozyten, die u.a. adhärenent zum Endothel erscheinen, lassen sich als helle Punkte erkennen. Beide Bilder zeigen das Mikrozirkulationsgeschehen bei 424-facher Vergrößerung.

3.3.3 Entnahme von Blut- und Gewebeproben

Nach Abschluss der Intravitalmikroskopie wurde den Versuchstieren durch Punktion der Vena cava inferior ca. 1 ml Vollblut entnommen und in Ca^{2+} -EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert. Nach Erstellung des Blutbildes wurde das Blut bei 4000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert (GS15 Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Das sich als Überstand absetzende Plasma wurde abpipettiert und bis zur Durchführung biochemischer Analysen bei -20°C aufbewahrt.

Nach Entnahme wurde ein Teil der Leber in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C für spätere Analysen aufbewahrt. Für spätere histologische Untersuchungen wurde ein Teil des Lebergewebes in vierprozentigem phosphatgepuffertem Formalin fixiert. Für die Analyse des metabolischen Energiestatus wurde eine spezielle Entnahmetechnik zur Leberprobengewinnung angewendet (siehe 3.3.7).

3.3.4 Plasmaanalytik

3.3.4.1 *Aktivität leberspezifischer Enzyme*

Die Alanin-Aminotransferase (**ALT**) bzw. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (**GPT**), die Aspartat-Aminotransferase (**AST**) bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (**GOT**) und die Glutamatdehydrogenase (**GLDH**) sind leberspezifische Enzyme, deren erhöhte Aktivitäten im Plasma bei Leberzellschädigung nachweisbar sind. Anhand ihrer Aktivität kann eine Aussage über die hepatozelluläre Desintegration getroffen werden. Das Enzym AST ist hauptsächlich in den Mitochondrien der Leberzellen lokalisiert und deutet bei Erhöhung auf eine stärkere Leberschädigung hin als ein alleiniger Anstieg der zytoplasmatischen ALT. Die Messung der Aktivitäten von ALT, AST und GLDH im Plasma erfolgte spektrophotometrisch nach *Bermeyer et al.* (Bergmeyer et al., 1978) unter Verwendung des Hitachi 704 Automatic Analysers (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und den entsprechenden Reagenzien (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

3.3.4.2 *Interleukin-6*

Zur Bestimmung der IL-6-Konzentration im Plasma wurde das Mouse IL-6- ELISA Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Vereinigte Staaten). Die Auswertung des Assays erfolgte spektrometrisch mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (ELISA-Reader Sunrise Remote, Tecan).

3.3.4.3 *Oxidativer Stress*

Der Gehalt an Malondialdehyd (**MDA**) im Plasma gilt als Indikator sowohl für die Lipidperoxidation als auch für den oxidativen Stress (Therond et al., 2000; Alonso de Vega et al., 2002). In dieser Studie wurde unter Verwendung der MDA-586-Methode (OxisResearch™, Portland, OR, USA) entsprechend der Herstelleranweisungen der MDA-Spiegel im Plasma bestimmt.

3.3.5 **Histologie und Immunhistochemie**

3.3.5.1 *Hämatoxylin-Eosin*

Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten in Dünnschnitt-Technik, wobei das am Ende des Versuches entnommene Lebergewebe zunächst in 4%iger Formalinlösung für 3 d fixiert und danach in Paraffin eingebettet wurde. Es folgte die Anfertigung von 4 µm dünnen Gewebe-Schnitten, welche auf poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern aufgebracht und getrocknet wurden. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (H.-E.). Lichtmikroskopisch konnten nun **nekrotische Zellschädigungen**, wie z.B. Schwellung, Vakuolisierung und Lysis, innerhalb dieser Schnitte visualisiert und quantifiziert werden.

3.3.5.2 *Cleaved Caspase-3*

Zur immunhistologischen Analyse der cleaved Caspase-3, einem Enzym im Signalweg der **Apoptose**, wurden aus den zuvor angefertigten Paraffinblöcken 4 µm dicke Schnitte angefer-

tigt und über Nacht mit einem polyklonalen cleaved Caspase-3-Antikörper (rabbit polyclonal cleaved caspase-3 antibody, 1:500, Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland) bei 4°C inkubiert. Dieser Antikörper ist in der Lage, endogene Level des großen Fragments der aktivierten Caspase-3 (17/19 kD) zu detektieren, nicht aber die Caspase-3 in voller Länge (Bordel et al., 2006). Zur Entwicklung der Probenträger wurde anschließend ein zweiter, Peroxidase-konjugierter Antikörper (1:20, HRP, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) angewendet, wobei 3,3'-Diaminobenzidin als Chromogen genutzt wurde. Folgend wurden die Proben mit Hämatoxylin gegengefärbt. Cleaved Caspase-3 positive Hepatozyten konnten nun unter dem Lichtmikroskop durch eine Rot-Braunfärbung erkannt werden. Die Auszählung von jeweils 30 Gesichtsfeldern pro Präparat erfolgte lichtmikroskopisch (x40/0.65W), wobei die Ergebnisse in der Einheit Zellen/mm² angegeben wurden.

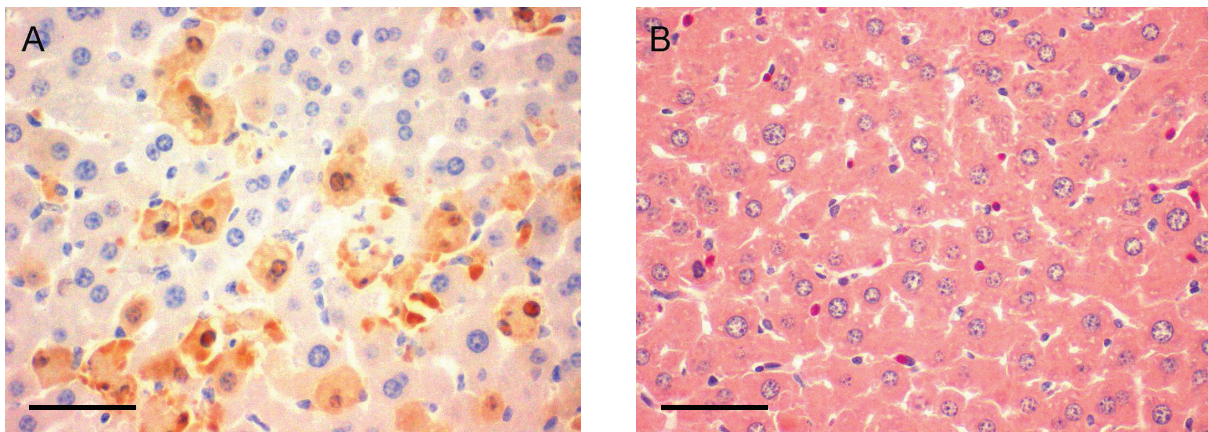


Abb. 14: Repräsentative Bilder von immunhistochemischen und histologischen Analysen des Lebergewebes. Abb. A zeigt den Ausschnitt eines Präparates zur Analyse der cleaved Caspase-3, in welchem sich positive Zellen durch eine Rot-Braunfärbung hervorheben. Abb. B zeigt den Ausschnitt eines Präparates zur Detektion von Leukozyten im Lebergewebe mittels CAE-Färbung. Leukozyten zeigen sich in einem leuchtenden Rot. — 50 µm.

3.3.5.3 Chloracetatesterase

Mit Hilfe der Chloracetatesterase- (CAE) Färbung kann eine **Leukozyteninfiltration** im Gewebe sichtbar gemacht werden. Die 4 µm dicken Paraffinschnitte werden hierfür entparaffiniert und gewaschen, um anschließend in eine Farblösung, bestehend aus Pararosanilin, Natriumnitrat, Dimethylformamid (Merck), Naphtol-ASD-Chloracetat (Fluka, Sigma-Aldrich) und Veronal-Acetat-Puffer getaucht zu werden. Die Schnitte wurden im Färbegrad für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden die Präparate vorsichtig mit Leitungswasser für fünf bis zehn Minuten gewaschen und danach mit Hämatoxylin ge-

gengefärbt. Als Ergebnis zeigen die sich im Gewebe befindlichen Leukozyten im lichtmikroskopischen Bild eine leuchtende Rotfärbung. Die Auswertung der angefertigten Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch durch Auszählung der CAE-positiven Zellen im gesamten Präparat (siehe 3.3.5.2).

3.3.6 Western Blot Analytik

Zur Bestimmung des Gehalts an **cleaved Caspase-9** und **Procaspase-8** im Lebergewebe diente die Analyse mittels Western Blot. Die bei -80°C gelagerten Proben wurden zur Gewinnung von Proteineextrakten gewogen, mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert und das pulverisierte Gewebe anschließend in Lysis- Puffer aufgenommen (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN₃, 0,2 mM PMSF und Protease-Inhibitor Cocktail 1:100 vol/vol; Sigma-Aldrich). Danach wurden die Proben zweimal für 10 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand jeweils dekantiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes in dem gewonnenen Überstand wurde mittels des BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Bonn, Germany) vorgenommen. Das in dieser Lösung enthaltene Kupfer komplexiert mit Proteinen und erzeugt dadurch, je nach Proteinkonzentration, einen spezifischen Farbumschlag. Dieser konnte nach spektrophotometrischer Analyse in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA-ReaderSunrise Remote, Tecan) durch Vergleich mit einem Proteinstandard quantifiziert werden. Die anschließende Einstellung der verschiedenen Proteinlösungen auf eine einheitliche Konzentration wurde durch die Verdünnung mit Aqua dest. erzielt. Zur Vorbereitung der Proben auf die Gel-Elektrophorese wurden gleiche Mengen an Protein mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proteine diskontinuierlich auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 12%) bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA (Sammelgel) bzw. 40 mA (Trenngel) entsprechend ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Für die spätere Molekulargewichtsbestimmung wurde auf das Gel zusätzlich zu den Proben ein Proteinstandard aufgetragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel zunächst in Methanol und Aqua dest. äquilibriert, um dann die aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix mittels eines Semi-Dry-Blotters bei einer konstanten Stromstärke von 275 mA auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) zu transferieren. Durch die anschließende Inkubation der Membran für mindestens 12 h bei 4°C in einer 5%igen BSA (bovine serum albumin) -Lösung konnte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erzielt werden.

Zum Nachweis des jeweiligen Proteins aus dem untersuchten Lebergewebe wurden die Membranen zuerst mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (rabbit anti-cleaved caspase-9, 1:1000, Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland; rabbit anti-procaspase-8, 1:1000, Cell Signalling Technology) und nach mehrmaligem Waschen in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 7,7 mM Tris-HCl pH 7,5, Wasser) sowie TBST-Puffer (TBS-Puffer, 0,3 % Tween-20) mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper (peroxidase-conjugated goat anti-rabbit cleaved caspase-9 1:2000, Procaspase-8 1:10000, Cell Signalling Technology) für jeweils 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und abermals zur Entfernung überschüssiger Antikörper mehrmals in TBST sowie TBS gewaschen. Die Detektion des an den Primär-Antikörper gekoppelten Sekundär-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL+™-Systems (ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Dabei katalysiert die an den Sekundär-Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase die Reaktion von Peroxiden mit dem Substrat PS-3 Acridian. Die Proteinexpression wurde dann mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz visualisiert und mit dem ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad Laboratories, München) digitalisiert. Die Signale wurden desitometrisch erfasst (Quantity One, Bio-Rad Laboratories) und für den Vergleich zwischen den Proben zum jeweiligen β -Aktin-Signal ins Verhältnis gesetzt.

3.3.7 Analyse des metabolischen Energiestatus

Um den hepatischen metabolischen Energiestatus beurteilen zu können, wurde eine Versuchsreihe mit zusätzlichen Tieren zur spezifischen Gewinnung der benötigten Leberproben durchgeführt. Dabei wurde die freipräparierte Leber mit Hilfe einer zuvor im Flüssigstickstoff vorgekühlten Klemme abgeklemmt, entnommen und bei -80°C für die späteren Analysen gelagert. Die Proben wurden gewogen und für mindestens fünf Tage in einem Vakuumfroster (-45°C , $< 0,001$ atm) konserviert. Nachdem das Gewebswasser durch die Gefriertrocknung entzogen war, wurden die Proben erneut gewogen, um das Trockengewicht zu bestimmen. Anschließend wurden die Proben mit Perchlorsäure (HClO_4 , 0,33 M) unter Verwendung eines Ultra-Turrax (Jahnke&Kunkel KG, Staufen i.Br., Deutschland) in Kälte homogenisiert und deproteinisiert. Nach Zentrifugation und Neutralisation des proteinfreien Überstandes wurde der Gehalt an energiereichen Phosphaten mittels eines standardisierten enzymatischen Tests und Nutzung der Hexokinase- und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktionen bestimmt (Minor et al., 2001). Die ermittelten **AMP-**, **ADP-** sowie **ATP-Gehalte** wurden in der Einheit $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht angegeben. Ein bedeutendes Enzym im Energiemetabolismus ist die

Adenylatkinase, welche die Reaktion $ADP + ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$ katalysiert, die unter physiologischen Bedingungen in einem strengen Gleichgewicht gehalten wird (Hardie et al., 2001). In Abhängigkeit des energetischen Zustands der Zellen generiert die Adenylatkinase ADP oder AMP. Unter Verwendung der ermittelten Daten wurden durch Berechnungen weitere Werte, wie das **ATP/ADP-Verhältnis** als Maß für den energetischen Zustand der Zellen sowie die „**mass action ratio**“ der Adenylatkinase-Reaktion ($ATP \times AMP / ADP^2$), bestimmt. Die „mass action ratio“ stellt ein Maß für die Enzymaktivität dar und gibt an, in welchem Umfang Metabolite dieser Reaktion außerhalb des Gleichgewichts anfallen (Crumm et al., 2008).

3.4 Überlebensstudie

Zur Beurteilung der Mortalität der Versuchstiere wurden in einem Doppel-Blind-Versuch zwei Gruppen von ATP8-Mutanten (B₆-FVB, n = 20) und Wildtyptieren (B₆, n = 20) in eine zufällige Reihenfolge gebracht und nummeriert, bevor sie eine D-GalN/LPS-Injektion (D-GalN 720 mg/kg KG i.p., LPS 10 µg/kg KG i.p.) erhielten, um das akute Leberversagen einzuleiten. Anschließend wurde alle 30 Minuten in den ersten zwölf Stunden und danach alle vier Stunden das Überleben der einzelnen Tiere überprüft und festgehalten. Als überlebend galten Tiere, die nach 48 Stunden noch am Leben waren.

3.5 Experimentelles Protokoll

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Mutation des mitochondrialen ATP8 Gens auf verschiedene Parameter in der Pathophysiologie des akuten septischen Leberversagens hat, wurden die verwendeten Versuchstiere in folgende Gruppen eingeteilt:

B₆ Sham	(Wildtypmäuse ohne Induktion eines ALV)
B₆ ALV	(Wildtypmäuse mit induziertem ALV)
B₆-FVB Sham	(ATP8-mutierte Mäuse ohne Induktion eines ALV)
B₆-FVB ALV	(ATP8-mutierte Mäuse mit induziertem ALV)

Für die Untersuchungen am Intravitalmikroskop waren zwischen sechs und acht Tiere jeder Gruppe zugehörig (n = 6 - 8). Die Versuchstiere der Gruppen **B₆ Sham** und **B₆-FVB Sham** erhielten zum Beginn der Untersuchungen eine intraperitoneale Injektion von Kochsalzlösung. Die Tiere der Gruppen **B₆ ALV** und **B₆-FVB ALV** erhielten zur Induktion des akuten Leberversagens eine intraperitoneale Injektion einer Kombination aus D-Galactosamin und LPS in der unter 3.2.1.2 genannten Dosierung. Fünf Stunden später wurde mit der Anästhesie und chirurgischen Präparation (siehe 3.2.2) der Tiere begonnen, um fünfeinhalb Stunden nach Versuchsbeginn die Untersuchungen mittels IVM (siehe 3.3.1.3) beginnen zu können. Während der Versuche wurde ständig das Schmerzempfinden der Versuchstiere geprüft und ggf. erneut Ketamin verabreicht. Folgende Parameter der hepatischen Mikrozirkulation wurden unter Verwendung der IVM untersucht:

1. hepatische sinusoidale Perfusion
2. postsinusoidales venuläres Leukozyten-Rolling
3. postsinusoidale venuläre Leukozytenadhäsion

Die Untersuchung am Intravitalmikroskop nahm etwa 30 Minuten in Anspruch. Anschließend wurde die Entnahme von Blut und Gewebeproben durchgeführt (siehe 3.3.3). Die Versuchstiere verstarben meist während der Blutentnahme, anderenfalls wurden sie unmittelbar vor der Entnahme von Lebergewebe durch eine Überdosis von Ketamin getötet.

Vorbehandlung	Ruhephase	Präparation	Mikroskopie	Entnahme von Blut- und Gewebeproben
t = 0	0 < t < 5,0 h	5,0 h < t < 5,5 h	t > 5,5 - 6 h	t ~ 6 h



Desweiteren wurden zusätzliche Versuche mit Tieren aller vier Versuchsgruppen (n = 6 - 9 pro Gruppe) durchgeführt, um Lebergewebe für die Analyse des hepatischen metabolischen Status asservieren zu können (siehe 3.3.7).

Vorbehandlung	Ruhepause	Entnahme von Lebergewebe mittels gekühlter Klemme
t = 0	0 < t < 6 h	t = 6 h



Zusätzlich wurde mit Tieren aus den Gruppen **B₆ ALV** und **B₆-FVB ALV** (n = 20 pro Gruppe) eine Überlebensstudie durchgeführt (siehe 3.3.8).

Induktion des ALV t = 0	Überprüfung des Überlebens alle 30 Minuten 0 < t < 12 h	Überprüfung des Überlebens alle vier Stunden 12 h < t < 48 h
--------------------------------	---	--



3.6 Statistik

Alle Versuche dieser Studie wurden im Blindversuch durchgeführt. Die Zuordnung der durch Nummern verschlüsselten Versuchstiere zu den einzelnen Gruppen wurde erst nach Abschluss der Auswertungen vorgenommen. Die bei der Auswertung der Videobänder, der histologischen Schnitte sowie der histochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen ermittelten Daten wurden zur elektronischen Datenverarbeitung direkt in Microsoft Excel Tabellen übertragen, um Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) errechnen zu können. Zur Erstellung von Diagrammen wurden die verarbeiteten Daten in das Programm SigmaPlot 9.0 (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA) importiert. Hierbei wurden alle Daten als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

Für die statistischen Analysen wurde das Programm SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) verwendet. Nach Testung der Normalverteilung der Werte durch Anwendung des Kolmogorov-Smirnof-Tests wurde für den Gruppenvergleich die einfaktorielle ANOVA-Analyse mit nachfolgendem Paarvergleich (Fisher-LSD) durchgeführt. Wurden die Kriterien für einen parametrischen Test nicht erfüllt, kam die Kruskal-Wallis ANOVA-Analyse, gefolgt vom Dunns Test zur Anwendung. Des Weiteren wurde zur Analyse der Überlebensstudie eine Testung nach Gehan-Breslow durchgeführt. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als fünf Prozent betrug ($p < 0,05$).

4 ERGEBNISSE

4.1 Inflammation

4.1.1 Hepatische Mikrozirkulation

4.1.1.1 Sinusoidales Perfusionsversagen

Die Induktion des akuten Leberversagens verursachte einen deutlichen Perfusionsausfall in den hepatischen Sinusoiden. So war in beiden Gruppen ohne D-GalN/LPS-Vorbehandlung eine Durchblutung nahezu aller Gefäße zu beobachten, während die Perfusionsrate in den Gruppen mit induziertem akuten Leberversagen um bis zu 40 % abfiel. Tiere der Gruppe B₆-FVB ALV zeigten einen gering erhöhten Perfusionsanteil gegenüber Tieren der Gruppe B₆ ALV, welcher aber nicht signifikant war (Abb. 15 A).

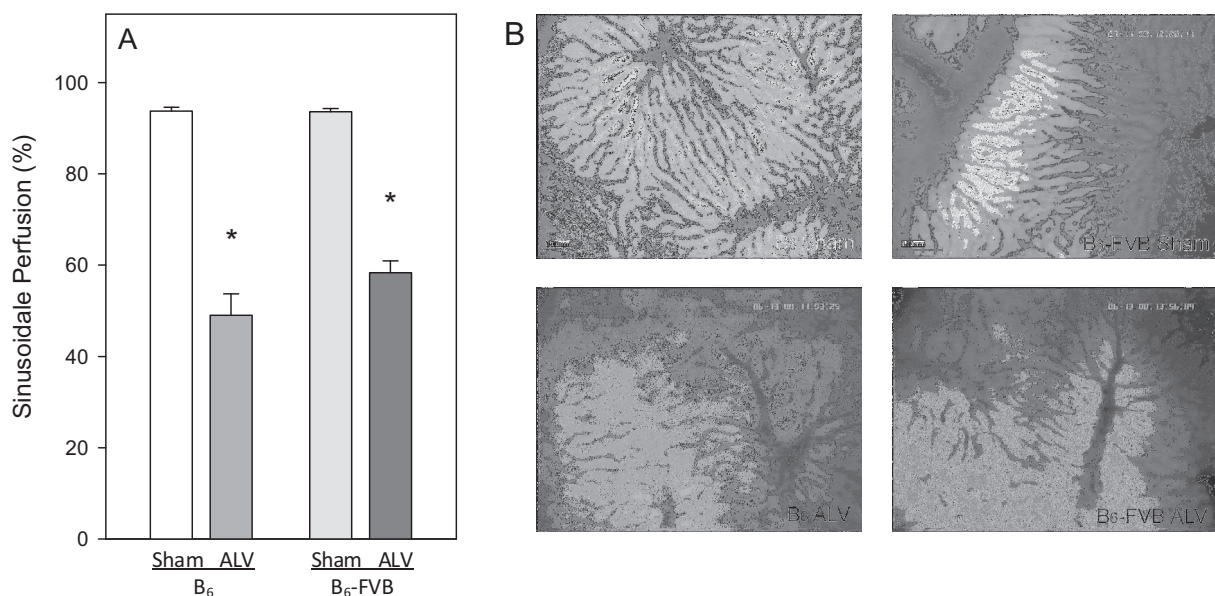


Abb. 15: Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse der hepatischen sinusoidalen Perfusion (A) sowie repräsentative Bilder derselben (B). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die intravitalmikroskopischen Analysen wurden fünfeinhalb Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung begonnen. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes.

4.1.1.2 *Intravasale Leukozytenretention*

Die Analysen der hepatischen Leukozytenretention und Akkumulation sind in den Abbildungen 16 A und 16 B illustriert.

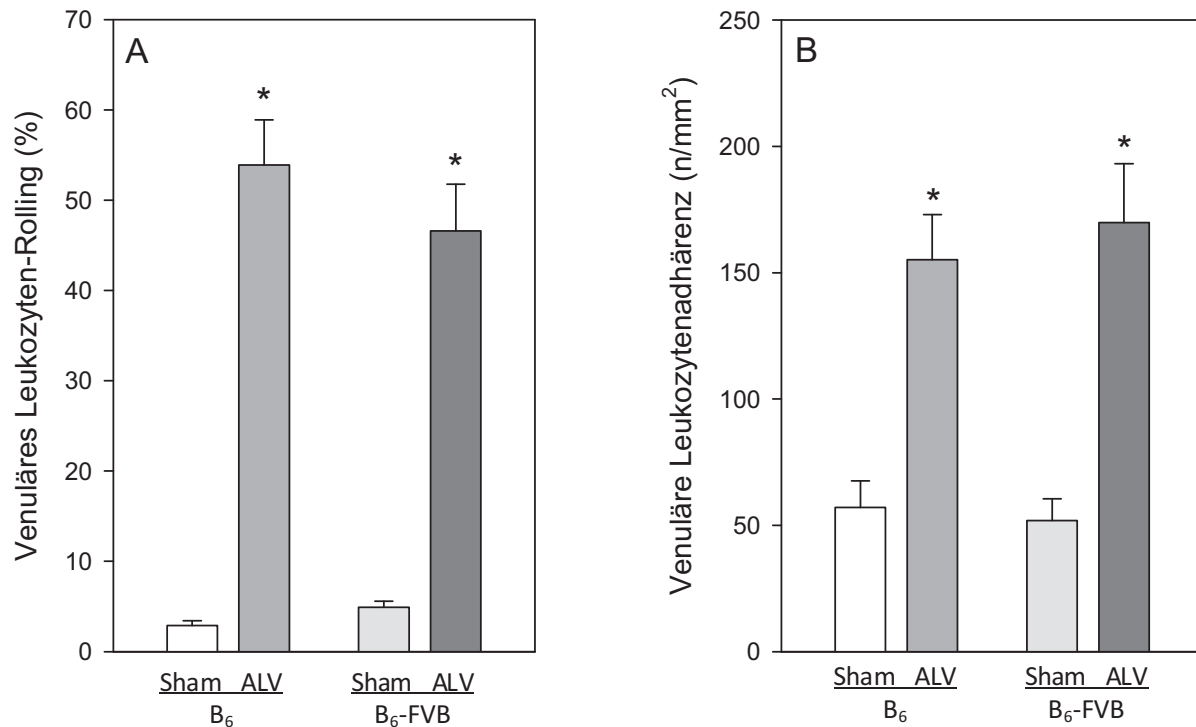


Abb. 16: Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse des Leukozyten-Rollings (A) und der postsinusoidalen venulären Leukozytenadhärenz (B). Zur Induktion des akuten Leberversagens erhielten die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die intravitalmikroskopischen Analysen wurden fünfeneinhalb Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung begonnen. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes.

In dieser Studie wurde der Anteil der rollenden Leukozyten an der Gesamtheit aller sich bewegenden Leukozyten als Parameter für die Leukozyten-Endothel-Interaktion in postsinusoidalen Venolen analysiert. Die Induktion des akuten Leberversagens durch D-GalN/LPS erhöhte den Anteil der rollenden Leukozyten teilweise um mehr als das zehnfache. Die Mutation des ATP8 Gens zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Fließverhalten der Blutzellen (Abb. 16 A).

Entsprechend den vorherigen Ergebnissen verursachte eine Gabe von D-GalN/LPS zudem einen Anstieg der venulären Leukozytenadhärenz, deren Ausmaß ebenfalls unabhängig von der Mutation des ATP8 Gens war (Abb. 16 B).

Zusammenfassend führte die intraperitoneale Injektion von D-GalN/LPS zur Entwicklung einer intensiven inflammatorischen Reaktion in beiden Gruppen, welche sich in den fluoreszenzmikroskopischen Analysen durch einen hepatischen sinusoidalen Perfusionsausfall sowie einer verstärkten hepatischen Leukozytenretention zeigte. Ein Einfluss der Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 auf die hepatische Mikrozirkulation, mit oder ohne Ausbildung eines akuten Leberversagens, konnte nicht nachgewiesen werden.

4.1.2 Hepatische parenchymale Leukozyteninfiltration

Mittels CAE-Färbung konnte die hepatische parenchymale Leukozyteninfiltration histologisch untersucht werden. Die Kontrolltiere beider Gruppen zeigten eine geringe Anzahl CAE-gefärbter Leukozyten in den histologischen Schnitten (Abb. 17 B). Nach D-GalN/LPS-Exposition kam es zu einem Anstieg der infiltrierten Leukozyten, der in beiden Gruppen signifikant war (Abb. 17A).

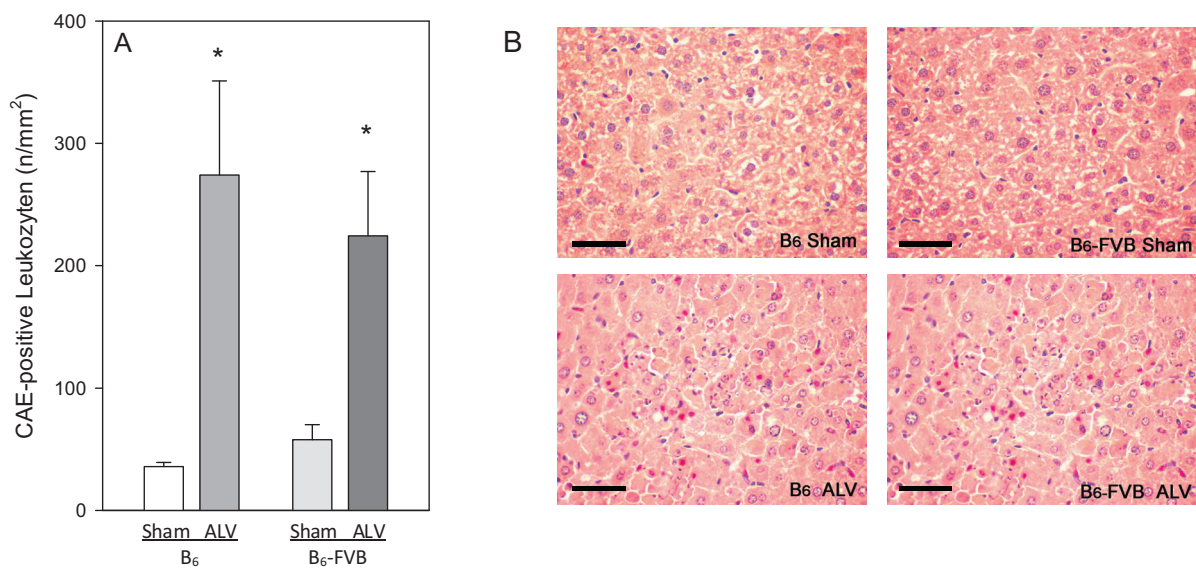


Abb. 17: Quantitative Analyse der hepatischen parenchymalen Leukozyteninfiltration (A) und repräsentative Bilder derselben (B). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆ FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme des Lebergewebes erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes. —50 µm.

4.1.3 Plasmakonzentration von IL-6

Um die inflammatorische Antwort während des induzierten akuten Leberversagens untersuchen zu können, wurden mittels ELISA die Plasmakonzentration des Zytokins IL-6 bestimmt. Die Werte der Kontrolltiere beider Gruppen waren vergleichbar. Die Exposition mit D-GalN/LPS führte in beiden Gruppen zu einem massiven Anstieg der IL-6-Konzentrationen im Plasma, wobei der genetische Hintergrund der Versuchstiere keinen klar erkennbaren Einfluss auf die Plasmakonzentration des Zytokins hatte (Abb.18 A).

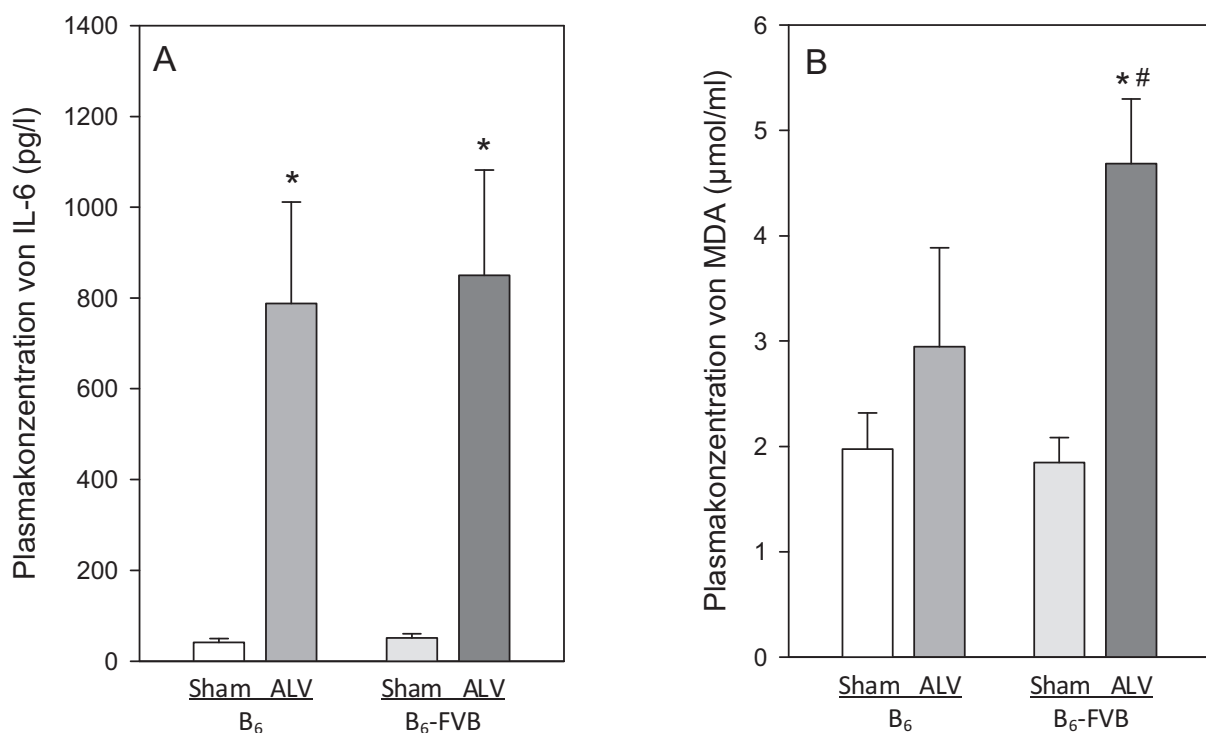


Abb. 18: Plasmakonzentration des Zytokins IL-6 (A) und quantitative Analyse der Plasmakonzentration von Malondialdehyd (B). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme der Blutproben erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes. # p < 0,05 vs. B₆ innerhalb der jeweiligen Vorbehandlung.

4.2 Oxidativer Stress

Die Analyse des plasmatischen MDA-Konzentration, welche als Indikator für oxidativen Stress gilt, zeigte einen deutlichen Einfluss der ATP8-Mutation auf die ermittelten Werte. Während die Plasmaspiegel der Kontrolltiere beider Gruppen noch vergleichbar waren,

kommt es bei ATP8-Mutanten nach D-GalN/LPS zu einem signifikant höherem Anstieg der Werte im Vergleich zu Wildtyptieren (4,7 $\mu\text{mol/ml}$ vs. 3,0 $\mu\text{mol/ml}$). Damit übertraf der plasmatische MDA-Spiegel der ATP8-Mutanten den der Wildtypiere um nahezu 60 % (Abb. 18 B).

4.3 Hepatischer metabolischer Energiestatus

Versuchstiere, bei denen ein akutes Leberversagen induziert wurde, zeigten wie erwartet einen deutlichen Abfall des ATP-Gehalts im Lebergewebe. Hierbei war der Abfall in ATP8-Mutanten signifikant geringer als in Wildtypmäusen (2,7 $\mu\text{mol/g}$ vs. 4,9 $\mu\text{mol/g}$; Abb. 19 A). Während sich die Konzentration an hepatischem ADP in Wildtypmäusen durch Induktion des akuten Leberversagens nur wenig verringerte, konnte bei ATP8-Mutanten ein signifikanter Abfall desselben beobachtet werden (siehe Abb. 19 B). Die Analyse des hepatischen Gehalts an AMP zeigte unabhängig von der Mutation des ATP8-Gens, das heißt in beiden Versuchsgruppen, einen etwa gleich großen Anstieg der AMP-Konzentration nach D-GalN/IPS-Exposition (Abb. 19 C).

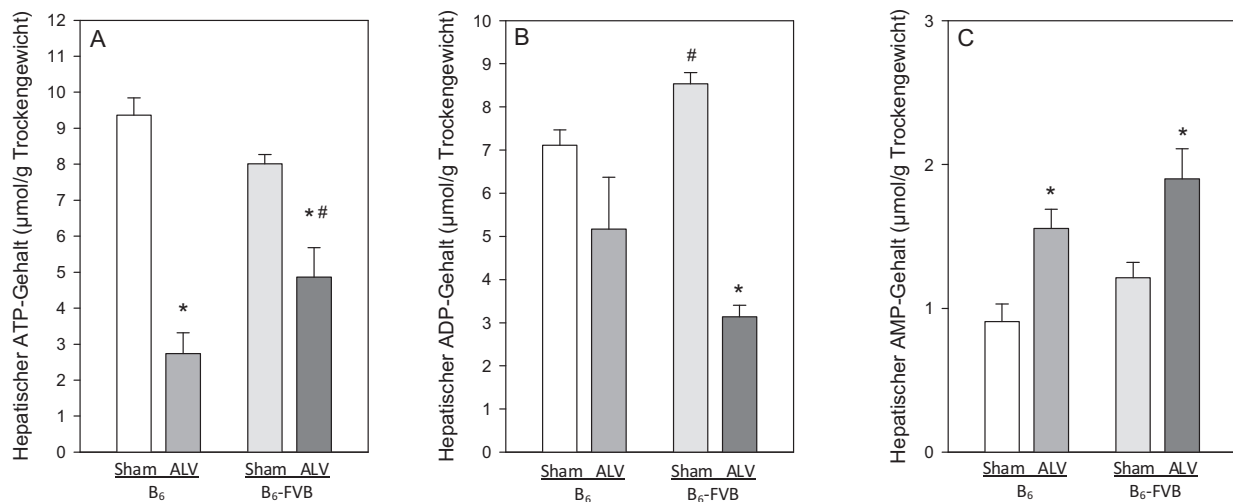


Abb. 19: Quantitative Analyse des hepatischen Gehalts an ATP (A), ADP (B) und AMP (C). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme der Gewebeprobe erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes. # $p < 0,05$ vs. B₆ innerhalb der jeweiligen Vorbehandlung.

Interessanterweise ergab die Kalkulation des Gehalts aller hepatischen Adeninnukleotide die gleichen Werte für die Kontrolltiere beider Gruppen und einen identischen Abfall der Kon-

zentrationen nach Induktion des akuten Leberversagens auf 55 % bzw. 56 % (Abb. 20 A). Für geschädigtes Lebergewebe kann das hepatische ATP/ADP-Verhältnis als Indikator für den Energiestatus der Leber verwendet werden (Brealey et al., 2004; Crumm et al., 2008). In der Studie zeigten Wildtyptiere einen signifikanten Abfall des ATP/ADP-Verhältnisses nach D-GalN/LPS-Exposition. Bemerkenswerterweise reagierten ATP8-Mutanten auf die Induktion des akuten Leberversagens mit einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses um 57 % (Abb. 20 B). Die Adenylatkinase-Reaktion ($ADP + ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$) generiert AMP als Antwort auf eine erhöhte ADP-Produktion in Zuständen mit hohem Energieverbrauch. Als Enzym steuert die Adenylatkinase die oben genannte Reaktion, um sie möglichst im Gleichgewicht zu halten. Die „mass action ratio“ der Adenylatkinase-Reaktion, ein Maß für deren Aktivität, stieg in ATP8-Mutanten nach Induktion des akuten Leberversagens stark an. Im Gegensatz dazu zeigte die Adenylatkinase in Wildtyptieren nur einen geringen Anstieg in ihrer Aktivität nach D-GalN/LPS-Exposition gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 20 C).

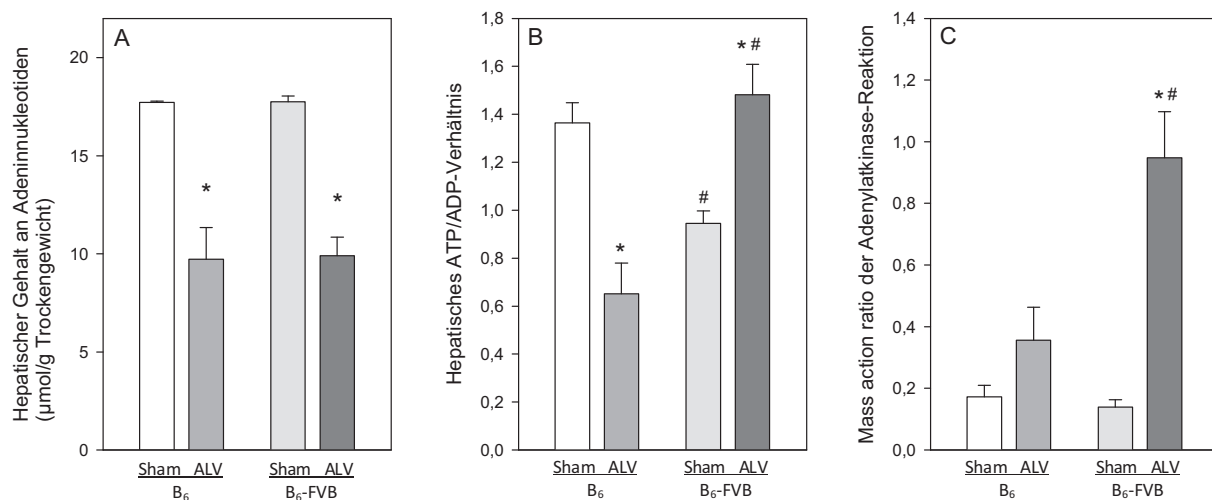


Abb. 20: Quantitative Analyse des hepatischen Gehalts aller Adeninukleotide (A), des ATP/ADP-Verhältnisses (B) und der mass action ratio der Adenylatkinase-Reaktion (C). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme der Gewebeprobe erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrunds. # p < 0,05 vs. B₆ innerhalb der jeweiligen Vorbehandlung.

4.4 Zelltod

4.4.1 Hepatozelluläre Integrität

4.4.1.1 Histopathologie

In den histologischen Schnitten der Tiere, die mit D-GalN/LPS vorbehandelt wurden, zeigten sich lichtmikroskopisch pathologische Veränderungen der Gewebearchitektur mit mikrovaskulärer Desintegration und dem Untergang von Hepatozyten. Weiterhin konnten morphologische Eigenschaften nekrotischer und apoptotischer Zellen, wie z.B. Vakuolisierung, intrazelluläre Ödeme mit Ruptur der Zellmembran sowie zelluläre und nukleare Lyse, an Hepatozyten beobachtet werden (Abb. 21).

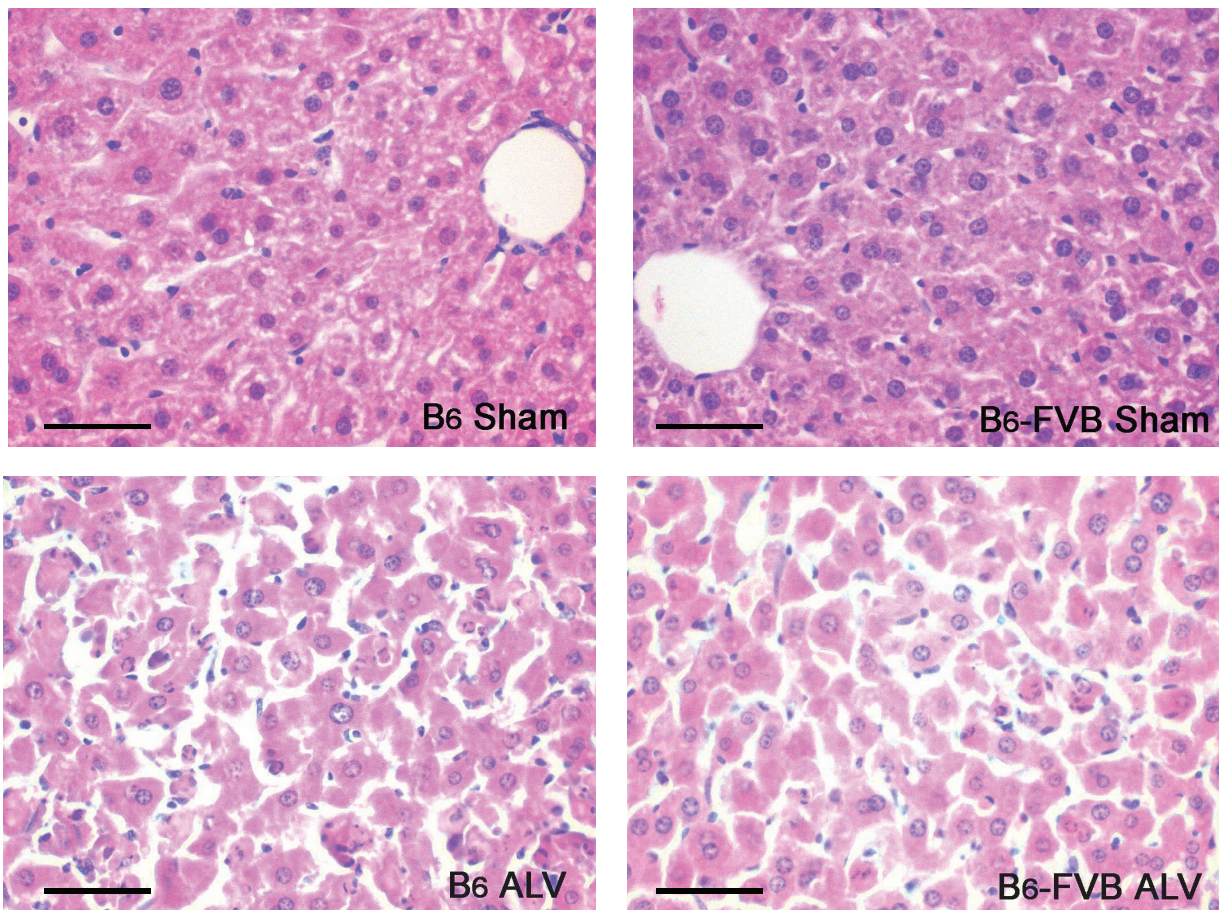


Abb. 21: Repräsentative Bilder von histologischen Schnitten nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D- GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme des Lebergewebes erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. —50 µm.

Innerhalb der Gruppen gab es leichte individuelle Unterschiede im Schweregrad der Schädigung. In den histologischen Präparaten der Kontrolltiere zeigten sich hingegen keine strukturellen Schädigungen des Parenchyms oder pathologische Veränderungen der Hepatozyten. Die Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 zeigte keinen lichtmikroskopisch erkennbaren Einfluss auf die Ausprägung der Leberzellschädigung.

4.4.1.2 Plasmakonzentration leberspezifischer Enzyme

Aktivitätserhöhungen der Transaminasen, wie ALT, AST, und anderen leberspezifischen Enzymen, wie z.B. GLDH, sind ein wichtiger Befund zur Beurteilung und Quantifizierung von Lebergewebsschädigungen. Die spektroskopischen Analysen der Enzymaktivitäten boten klare Zeichen für eine Schädigung der hepatozellulären Integrität. Die Aktivitäten der ALT, AST und GLDH steigerten sich nach Induktion des akuten Leberversagens deutlich, wobei diese Aktivitätserhöhungen bei den ATP8-Mutanten wesentlich geringer ausfielen. Bei der ALT war der Anstieg sogar signifikant geringer als bei den Wildtyptieren (Abb. 22).

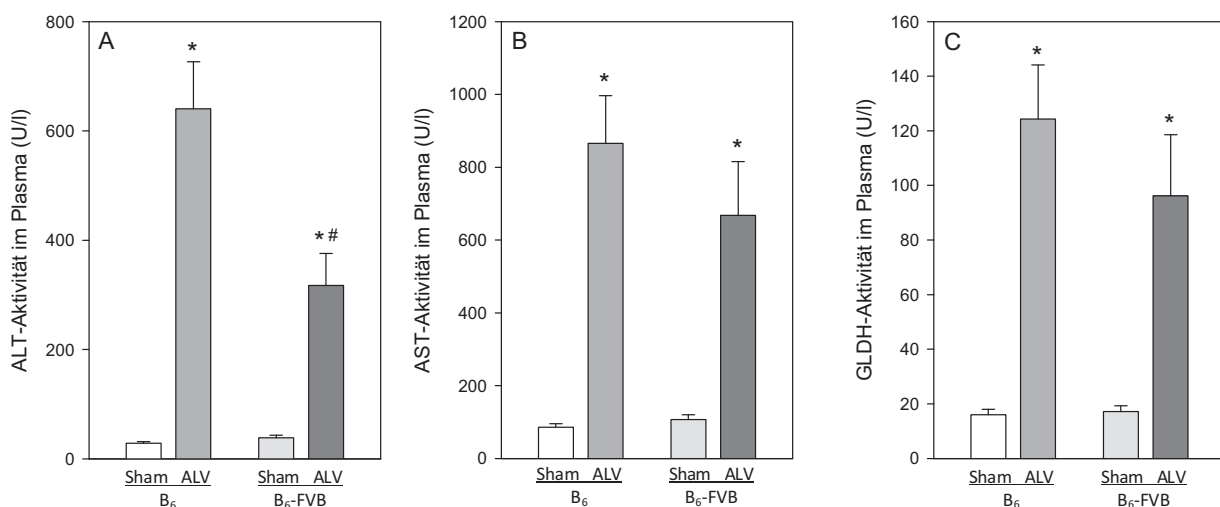


Abb. 22: Plasmaaktivitäten der ALT (A), AST (B) und GLDH (C). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme der Blutproben erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes. # p < 0,05 vs. B₆ innerhalb der jeweiligen Vorbehandlung

4.4.2 Hepatozelluläre Apoptose

4.4.2.1 Quantitative Bestimmung mittels Immunhistochemie

Zur Analyse der hepatozellulären Apoptose wurde eine immunhistochemische cleaved Caspase-3-Färbung vorgenommen. Unter Kontrollbedingungen zeigten ATP8-Mutanten gegenüber den Wildtyptieren eine leicht erhöhte Apoptoserate. In beiden Versuchsgruppen stieg die Zahl positiver Zellen nach D-GalN/LPS Exposition erheblich im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Absolutzahlen der cleaved Caspase-3 positiven Zellen nach Induktion des akuten Leberversagens war in beiden Versuchsgruppen mit 59 n/mm² vs. 56 n/mm² etwa gleich groß (Abb. 23).

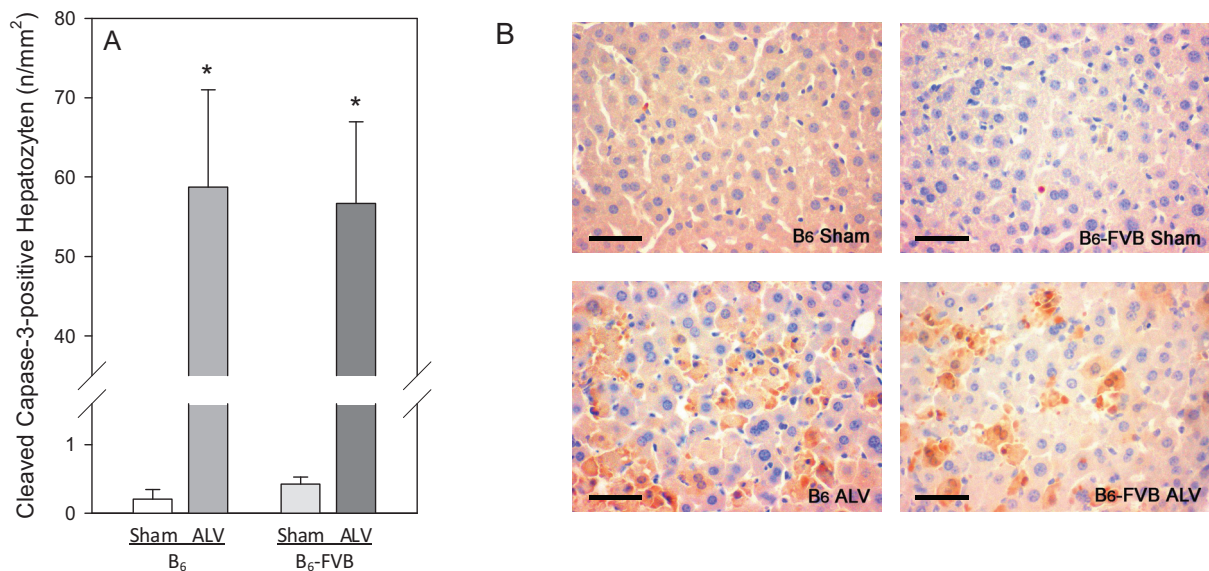


Abb. 23: Quantitative Analyse der cleaved Caspase-3-positiven Hepatozyten durch immunhistochemische Schnitte des Lebergewebes (A) und repräsentative Bilder derselben (B). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme des Lebergewebes erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes. —50 µm.

4.4.2.2.1 Spezifische Beurteilung mittels Western-Blot-Analysen

Um die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Apoptose zu spezifizieren, wurden zusätzlich Western Blot Analysen der apoptosespezifischen Proteine cleaved Caspase-9 und Procaspase-8 durchgeführt. Beide Proteine waren in den Kontrolltieren beider Versuchsgrup-

pen nicht detektierbar. Die Expression der für den extrinsischen Aktivierungsweg der Apoptose spezifischen Procaspase 8 war in den Wildtypmäusen nach D-GalN/LPS-Applikation im Vergleich zu den ATP8-Mutanten annähernd um die Hälfte reduziert (0,043 vs. 0,079; Abb. 24 A). Die Analyse der für den intrinsischen Aktivierungsweg spezifischen cleaved Capase-9 erbrachte dagegen ein gegensinniges Ergebnis. Nach Induktion des akuten Leberversagens zeigten die Wildtyptiere im Vergleich zu den ATP-Mutanten eine annähernd doppelt so hohe Expression der cleaved Capsase-9 (1,08 vs. 0,61; Abb. 24 B).

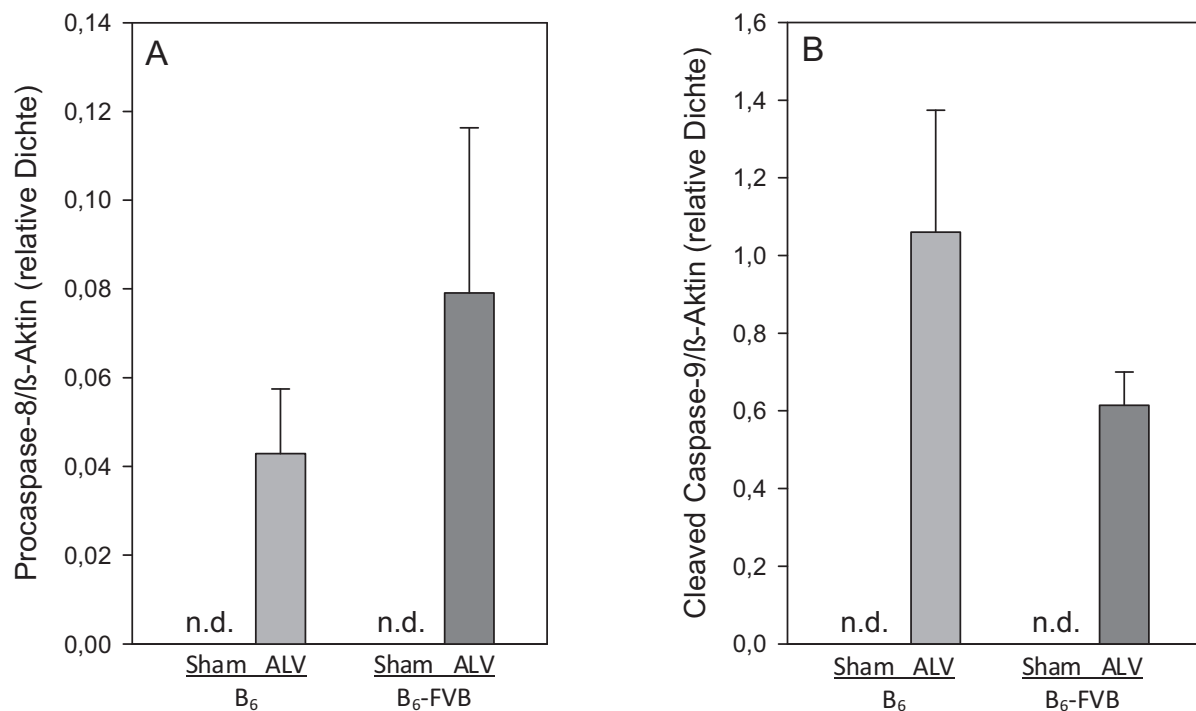


Abb. 24: Quantitative densitometrische Analyse der Procaspase-8 (A) sowie der cleaved Capase-9 (B). Zur Induktion des akuten Leberversagens wurden die Tiere der Gruppen B₆ ALV und B₆-FVB ALV mit einer Injektion von D-GalN/LPS vorbehandelt. Die Kontrolltiere der Gruppen B₆ Sham und B₆-FVB Sham erhielten dagegen eine Injektion von Kochsalzlösung. Die Entnahme der Gewebeprobe erfolgte sechs Stunden nach der entsprechenden Vorbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich. n.d.-nicht detektierbar.

4.5 Überlebensstudie

ATP8-Mutanten zeigten nach Induktion des akuten Leberversagens durch D-GalN/LPS-Injektion eine bessere Überlebensrate im Vergleich zu den Wildtyptieren. Alle Tiere überlebten die ersten sechs Stunden der Studie, das erste Tier starb in der siebten Stunde nach Versuchsbeginn. 48 Stunden nach Induktion des akuten Leberversagens waren 3 (ATP8-kompetent) bzw. 8 (ATP8-mutiert) von jeweils 20 Versuchstieren noch am Leben. Der Über-

lebensvorteil der ATP8-Mutanten war mit 35 % gegenüber 15 % bei den Wildtypmäusen allerdings nicht signifikant ($p = 0,096$; Abb. 25).

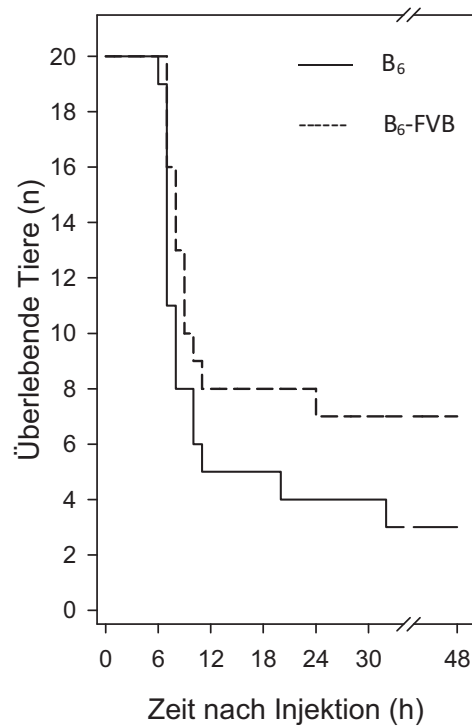


Abb. 25: Überlebensstudie nach D-GalN/LPS-Injektion. Zur Induktion des akuten Leberversagens erhielten die ATP8-kompetenten (B₆) und ATP8-mutierten (B₆-FVB) Tiere eine Injektion mit D-GalN/LPS. Tiere, die innerhalb von 48 Stunden nicht verstarben, galten als überlebend.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende experimentelle Studie untersuchte mittels Intravitalmikroskopie und anderen etablierten Analysetechniken die mikrozirkulatorischen sowie energiemetabolischen Parameter nach Induktion des akuten septischen Leberversagens durch die intraperitoneale Injektion von D-GalN/LPS sowie den Einfluss einer Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 auf diese pathophysiologischen Vorgänge. Um die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente zu verifizieren und einen möglichen Einfluss der Genmutation sowie dessen Mechanismus ermitteln zu können, wurden biochemische, histologische, immunhistochemische sowie molekularbiologische Untersuchungen genutzt. Die Ergebnisse der Studie können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die Applikation von D-GalN/LPS verursacht eine schwere Schädigung des Lebergewebes in den Versuchstieren, welche sich durch eine massive intrahepatische Leukozytenakkumulation, gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, einen schweren sinusoidalen Perfusionsausfall sowie die systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine manifestierte. Es zeigte sich eine hohe Rate an Apoptose und Nekrose, welche mit gesteigerten Aktivitäten von Leberenzymen assoziiert war.
2. Die Mitochondrien, die Kraftwerke der Zellen, nehmen in der Pathophysiologie des akuten septischen Leberversagens eine bedeutende Rolle ein. In der Umgebung einer Inflammation kam es in den Mitochondrien zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen. Die Funktion der Atmungskette war eingeschränkt. Es zeigte sich ein deutlicher Abfall des ATP-Gehalts im Gewebe. Der zelluläre Energiestatus fiel nach Induktion des akuten Leberversagens massiv ab.
3. Die Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 hatte keinen Einfluss auf die Ausprägung der Inflammationsreaktion nach D-GalN/LPS-Exposition. Die Mutation des Gens wirkte sich allerdings deutlich auf den Energiemetabolismus im akuten septischen Leberversagen aus. ATP8-mutierte Tiere zeigten einen deutlich besseren Energiestatus der Hepatozyten mit einer erhöhten ATP-Konzentration und einem größeren ATP/ADP-Verhältnis.

4. ATP8-mutierte Tiere zeigten eine weniger ausgeprägte Nekrose mit entsprechend niedrigeren Leberenzymaktivitäten. In der Überlebensstudie konnte zudem eine geringere Mortalität dieser Tiere gezeigt werden.
5. Die Mutation des ATP8 Gens beeinflusste die Aktivierungswege der Apoptose. Bei ATP8-mutierten Tieren kam es unter einer Inflammationsreaktion zu einer Verstärkung des extrinsischen und zu einer Drosselung des intrinsischen Aktivierungswegs. Die Gesamtrate der Apoptose erwies sich als unabhängig von der Genmutation.
6. Die vorliegende Studie zeigt, dass die Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 keinen Einfluss auf die Ausprägung der Inflammationsreaktion nach D-GalN/LPS-Applikation hatte. Jedoch konnte gezeigt werden, dass ATP8-Mutanten im Zustand des akuten Leberversagens besser in der Lage sind, das energiemetabolische Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Die erhöhte Aktivität der Atmungskette geht jedoch mit einer signifikanten Steigerung der ROS-Produktion einher. Obwohl es in den ATP8-Mutanten Tieren zu einer Verschiebung des extrinsischen und intrinsischen Aktivierungswegs der Apoptose kam, war das Ausmaß der Apoptose in der Summe in beiden Mausstämmen vergleichbar hoch. In der Gesamtheit dieser Ereignisse resultiert ein signifikant verringerter Leberschaden bei den ATP-8-mutierten Tieren. Schlussendlich führt diese zu einer tendenziell höheren Überlebenschance beim akuten Leberversagen

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion von Material und Methoden

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer Mutation des mitochondrialen ATP8-Gens auf pathophysiologische Vorgänge des akuten septischen Leberversagens unter der Verwendung des D-GalN/LPS-Tiermodells untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf die mikrohämodynamischen, energiemetabolischen sowie funktionellen Auswirkungen der Genmutation gelegt wurde.

5.1.1 Das Tiermodell des akuten septischen Leberversagens

Trotz großer Fortschritte im Bereich der Intensivmedizin in den letzten Jahren bleibt die Mortalität der Patienten mit einer Sepsis weiterhin hoch. Für die Erforschung von Erkrankungen und die Erprobung neuer Therapieansätze sind standardisierte Tiermodelle von großer Bedeutung und stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen molekular- sowie zellbiologischen Untersuchungen und klinischen Studien dar (Menger et al., 1999; Wu, 2006). Obwohl viele Therapieansätze präklinisch erfolgreich waren und vielversprechend erschienen, zeigten die eingesetzten Substanzen in kontrollierten, randomisierten klinischen Studien oft keine effektive Wirksamkeit, was ein großes Problem der medizinischen Forschung darstellt (Deitch, 1998; Koike, 2004).

Die Entwicklung eines Tiermodells, welches die klinischen Parameter und Symptome einer Sepsis adäquat widerspiegelt, ist und bleibt eine große Aufgabe, da das zu simulierende klinische Krankheitsbild sehr komplex und mannigfaltig ist (Deitch, 1998; Koike, 2004; Remick und Ward, 2005). Für die Durchführung einer Studie unter septischen Bedingungen stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, welche die Pathophysiologie der humanen Sepsis simulieren. Häufig angewendete Modelle sind die intravenöse Applikation von lebenden Organismen oder Endotoxinen (z.B. LPS), die Zökalligation und -punktion (CLP, cecal ligation and puncture) sowie das Einnähen eines Stents in das Colon ascendens (CASP, colon ascendens stent peritonitis) (Rittrisch et al., 2007).

Bei der Durchführung des CLP-Modells wird das Zökum unterhalb der Ileozökalklappe ligiert und anschließend mit einer Nadel punktiert. Aus dem so künstlich geschaffenen Leck wird nun etwas Darminhalt herausgedrückt, so dass sich als Folge eine polymikrobielle Peritonitis entwickelt (Zhang et al., 2007). Mit zunehmender Größe der zur Punktion verwendeten Nadel und somit der Perforation in der Darmwand steigt die Letalität der Versuchstiere (Benjamin et al., 2002). Beim CASP-Modell wird ein Stent in das Colon ascendens der Versuchstiere eingebracht, womit eine Verbindung zwischen dem Darmlumen und dem Peritoneum geschaffen wird, was einen kontinuierlichen Austritt von Darminhalt und Bakterien in die Bauchhöhle gewährleistet (Zantl et al., 1998). Beide Modelle benötigen zur Ausbildung der Sepsis-Symptomatik einen relativ langen Zeitraum und simulieren am ehesten die Situation septischer Patienten, die als Folge eines chirurgischen Eingriffs erkranken (Remick und Ward, 2005). Dabei imitiert das CASP-Modell eher den klinischen Verlauf einer diffusen Peritonitis und der sich langsam daraus entwickelnden systemischen Inflammationsreaktion als das CLP-Modell, welches eher eine Simulation eines intraabdominellen Abzesses mit länger anhaltender und milderer Inflammation darstellt (Maier et al., 2004). Neben der langen Versuchszeit weisen beide Modelle noch andere Nachteile auf. Ein Teil der Entzündung wird durch den stark traumatisierenden Eingriff zur Sepsisinduktion selbst und somit unabhängig von der bakteriellen Belastung verursacht. Zudem sind die Modelle schwer standardisierbar, da das Ausmaß der fäkalen Kontamination der Peritonealhöhle und somit die bakterielle Belastung nicht adäquat kontrollierbar sind. Hinzu kommt, dass die Art der freigesetzten, die Sepsis auslösenden Keime schwer zu definieren ist (Wichterman et al., 1980; Freise et al., 2001). Kleine Unterschiede in Größe und Anzahl der Perforationen sowie die Menge der Flüssigkeitszufuhr führen zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen, einem differierenden zeitlichen Verlauf und einer veränderten 24-Stunden-Überlebensrate (Wichterman, 1980; Freise et al., 2001; Otero-Antón et al., 2001). Aus all diesen Nachteilen lässt sich schlussfolgern, dass die anhand dieser Modelle gewonnenen Ergebnisse bedingt reproduzierbar sind und sich schlecht vereinheitlichen lassen (Fink und Heard, 1990).

Die intraperitoneale oder intravasale Bolusinjektion mit einer definierten Menge an Lipopolysaccharid (LPS) ist das einfachste und am weitesten verbreitete nichtinfektiöse Tiermodell der Sepsis (Eipel et al., 2004; Horner et al., 2004; Klintman et al., 2004; Masaki et al., 2005). Dieses Modell, welches eine letale Endotoxämie darstellt, reproduziert viele Charakteristika einer gram-negativen Sepsis und garantiert eine hohe Standardisierung (Freise et al., 2001; Wang et al., 2001). Bakterielle Endotoxine wie LPS induzieren, vermittelt durch das

angeborene Immunsystem, eine hochgradig inflammatorische sowie prokoagulatorische Immunantwort, welche bis zu einem letalen septischen Schock der Versuchstiere führen kann. Aus einer Vielzahl präklinischer Studien geht hervor, dass aus einer Hemmung des Endotoxins in experimentellen Tiermodellen ein Überlebensvorteil resultiert (Opal und Glück, 2003). In klinischen Studien konnten zudem Endotoxine im systemischen Kreislauf von septischen Patienten nachgewiesen werden (Opal und Glück, 2003). Da die Wachstumskinetik und die Zerstörung von Bakterien mittels des Immunsystem durch das LPS-Modell nicht erfasst werden, wird in Frage gestellt, ob dieses Modell die klinische Situation einer humanen Sepsis ausreichend imitiert (Remick und Ward, 2005).

Die Entwicklung einer Leberfunktionsstörung und eines akuten Leberversagens sind eine wesentliche Ursache der hohen Morbidität und Mortalität von Patienten mit einer gramnegativen Sepsis (Baue, 1994; Livingston und Deitch, 1995). Dieser Tatsache Rechnung tragend wurde den Versuchstieren in dieser Arbeit zur Simulation eines akuten septischen Leberversagens neben dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) zusätzlich der Aminosucker D-Galaktosamin (D-GalN) injiziert. (Galanos et al., 1979). Es ist bekannt, dass Nagetiere eine im Vergleich zum Menschen um über das 1000-fache geringere Empfindlichkeit gegenüber LPS aufweisen (Leist et al., 1995). Galaktosamin, welches ausschließlich in der Leber metabolisiert wird und dort eine selektive Depletion von Uridinnukleotiden sowie einen Transkriptions- und Translationsblock verursacht, führt nach Applikation zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber LPS (Galanos et al., 1979; Leist et al., 1995). Die hepatotoxische Wirkung von Galaktosamin ist seit Jahrzehnten bekannt (Keppler et al., 1968). Zu Studienzwecken wurde es unter anderem zur Induktion einer Hepatitis bei Ratten (Keppler et al., 1968) und Hunden (Patzner et al., 2002) angewandt. Die Galaktosamin-induzierte Hepatitis dient auch gegenwärtig als Modell der Erforschung neuer potentieller Arzneistoffe für dieses Krankheitsbild (Han et al., 2006).

Neben der chemischen Induktion eines Leberschadens existieren zudem Tiermodelle, die das akute Leberversagen durch chirurgische Eingriffe, zugefügte Traumata oder einen Ischämie-Reperfusionsschaden einleiten. Die Induktion des akuten Leberversagens unter Verwendung von chemischen Reagenzien nimmt dabei die bedeutendste Stellung ein (Newsome et al., 2000). Neben Galactosamin (Galanos et al., 1979) werden hierbei auch andere hepatotoxische Substanzen, wie Tetrachlorkohlenstoff (Slater, 1984), Thioacetamid (Mehendale, 2005), Nitrosamine (Sutherland et al., 1977), Acetaminophen bzw. Paracetamol (Walker et al., 1985)

sowie halogene Anästhetika (You et al., 2006) verwendet. Unter den hier genannten Substanzen ist Acetaminophen wohl die bekannteste und meist verwendete für das Modell des akuten Leberversagens. Als Vorteil kann gewertet werden, dass der Wirkstoff als Ursache vieler klinischer Leberversagen bekannt ist und zudem ein wirksames Antidot (N-Acetylcystein) existiert. Dagegen stellen die Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit und die extrahepatische Toxizität von Acetaminophen die Nachteile dieses Modells dar (Newsome et al., 2000). Das ideale Tiermodell des akuten Leberversagens, welches reversibel, reproduzierbar, tödlich, über ein therapeutisches Fenster verfügend, übersichtlich und hinsichtlich der Anwendung risikoarm sein müsste (Terblanche und Hickman, 1991), ist bis heute weit von einer Realisierung entfernt (Newsome et al., 2000).

Keines der hier diskutierten Modelle ist in der Lage, die vollständige Komplexität einer Sepsis mit begleitendem akuten Leberversagen widerzuspiegeln, so dass durch sie immer nur ein kleiner Ausschnitt der Pathogenese betrachtet werden kann (Marshall et al., 2005). Allein die speziesspezifischen Unterschiede in den anatomischen Verhältnissen und metabolischen Abläufen erschweren die Übertragung von Studien an Tiermodellen auf den Menschen. Zudem wird selten berücksichtigt, dass septische Patienten oft ein hohes Alter und viele Komorbiditäten aufweisen. Zusätzlich dazu führen die auf den Intensivstationen angewandten Therapien, wie Volumensubstitution oder Beatmung, zu einer sehr beschränkten Möglichkeit, die in Tierexperimenten erfolgversprechenden Therapieoptionen direkt auf den Menschen zu übertragen (Esmon et al., 2004; Rittirsch et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurde eine Kombination aus Galaktosamin und Lipopolysaccharid zur Induktion des akuten septischen Leberversagens verwendet. Dieses Modell ist für Analysen der Mikrozirkulation besonders geeignet, da in ihm die pathophysiologischen Vorgänge und Veränderungen, wie die Inflammation, das Perfusionsversagen sowie die Apoptose und Nekrose, deutlich ausgeprägt sind (Qiu et al., 2006; Eipel et al., 2007). Obwohl die sehr schwere und sehr schnell eintretende Leberschädigung es unmöglich macht, das Zeitfenster für die Untersuchungen zu verlängern, werten Eigenschaften wie die gute Reproduzierbarkeit, die hepatoselektive Toxizität sowie ein geringes Risiko in der Anwendung dieses Modell auf.

Die zur Durchführung dieser Studie verwendeten C57BL/6J Mäuse entstammen dem am weitesten verbreiteten Stamm, welcher zu Versuchszwecken gezüchtet wird. Mäuse dieses Stammes wurden für experimentelle Studien in der Krebsforschung (Berkelhammer et al.,

1982), der Hämatologie (Lebeau et al., 2002), der Neurologie (Sundström et al., 1990), der Endokrinologie (Schreyer et al., 1998), der Infektiologie und Immunologie (Cohen et al., 1995; Blier und Bothwell, 1988) und zur Entwicklung von Impfstoffen (Vladoianu und Dubino, 1975) verwendet. C57BL/6J-Mäuse sind als Versuchstiere im Modell des akuten Leberversagens sehr verbreitet (Galanos et al., 1979; Leist et al., 1995; Angermüller et al., 1998; Endo et al., 1999; Tapalanga et al., 2002; Le Minh et al., 2007; Eipel et al., 2007). Die in dieser Arbeit angewandten Dosen von D-GalN/LPS wurden wie in den eben genannten Studien gewählt.

Mit dem Wissen, dass die Versuchstiere zwischen der sechsten und achten Stunde nach D-GalN/LPS-Exposition versterben (Endo et al., 1999; Le Minh et al., 2007; Eipel et al., 2007), wurden die Untersuchungen fünfeinhalb Stunden nach Induktion des akuten Leberversagens begonnen. Dieser Zeitpunkt ermöglicht es, deutliche pathophysiologische Veränderungen in den Versuchstieren vorzufinden und zeitgleich einen unerwarteten Tod der Tiere während der Experimente weitestgehend zu vermeiden.

5.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Die Intravitalmikroskopie stellt eine der Hauptuntersuchungstechniken dieser Studie dar. Dieses Verfahren ist für die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation besonders geeignet und wurde zur Analyse von pathologischen Veränderungen bei einer Reihe von Erkrankungen häufig angewendet (Lehr et al., 1999).

Bereits vor der Ära der Intravitalmikroskopie wurde versucht, die mikrovaskuläre Struktur der Leber zu porträtieren, was allerdings auf die Auswertung von histologischen Präparaten beschränkt blieb (Menger et al., 1991). Diese Aufgabe wurde mit Blick auf die Analyse von pathologischen Prozessen noch schwieriger, da hierbei die Kinetik der pathophysiologischen Vorgänge von entscheidender Bedeutung ist. Im Laufe der Zeit wurden zur Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation verschiedenste Methoden vorgeschlagen, unter anderem die Autoradiographie (Grisham, 1962), ^{133}Xe - (Bolmsjö et al., 1983) und H_2 -Auswaschungen (Koeppel et al., 1997), die Thermodiffusion (Klar et al., 1996), die Flussmessung mittels Laser-Doppler-Verfahren (Arvidsson et al., 1988; Vollmar et al., 1994a) sowie die Partialdruckmessung des Gewebssauerstoffes (Vollmar et al., 1992; Crerar-Gilbert et al., 2002;

Knudson et al., 2003). Die Intravitalmikroskopie bietet gegenüber den zuvor genannten Methoden den großen und entscheidenden Vorteil, dass sie das hepatische mikrovaskuläre Strombett direkt visualisieren kann (Menger et al., 1991). Mit Hilfe der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie lassen sich, im Kontrast zu den *ex vivo* Analysen, physiologische sowie pathophysiologische Prozesse direkt im lebenden Organismus darstellen und somit die Zellen in ihrem physiologischen Milieu beobachten (Vollmar und Menger, 2009).

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Intravitalmikroskopie zur Analyse der nutritiven Perfusion und von Zell-Zell-Interaktionen angewendet. Als mittlerweile weitbekannte Untersuchungstechnik erlebte sie jedoch erst in den vergangenen beiden Jahrzehnten den Durchbruch in der Wissenschaft (Vollmar und Menger, 1998). Die Intravitalmikroskopie stellt für die Forschung ein attraktives Mittel zur Analyse und Beurteilung von mikrovaskulären, zellulären und molekularen Pathomechanismen der verschiedensten Krankheiten dar (Menger et al., 1999). So fand sie Anwendung in Studien der Inflammation (Smedegard et al., 1985), zur Analyse von fibrotischen und zirrhotischen Prozessen (Vollmar et al., 1997b; Nakata et al., 2002), der Angiogenese (Menger et al., 1990), der Pathogenese der Arteriosklerose (Eriksson et al., 2001; Siegel-Axel et al., 2006) und mikrovaskulärer Thrombosen (Renné et al., 2006; Sorg et al., 2007), der Tumorgenese (Tozer et al. 2001; Klenke et al., 2005; Kollmar et al., 2007) sowie des Diabetes (Lindenblatt et al., 2006; Scalia et al., 2007). Weiterhin diente die Intravitalmikroskopie als Technik für die Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen bei Ischämie/Reperfusion (Khandoga et al., 2003; Schoen et al., 2007), nach Transplantation (Jain et al., 2004; Preissler et al., 2006) und Trauma (Langer et al., 2005; Amon et al., 2006). Neben Mäusen (Rappaport, 1977; Le Minh et al., 2007; Eipel et al., 2007) dienten auch Ratten und Hamster (Menger et al., 1991; Vollmar et al., 1994; Cantré et al., 2008), Kaninchen (McCuskey, 1966; Eichhorn et al., 2002; Rücker et al., 2005) sowie Hunde und Affen (Bloch, 1955; Habazettl et al., 1994) als Versuchstiere für diese Experimente.

In den 30iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die erste intravitale Mikroskopie mittels Trans-Illumination beschrieben, die die bisherige Epi-Illuminationstechnik ablöste und nun lebende Strukturen für mikroskopische Studien sichtbar machte (Menger et al., 1991). Bei Verwendung der Transilluminationstechnik ist das einsehbare Areal stark limitiert, da sie eine sehr dünne Gewebssdicke voraussetzt, so dass sogar bei Nagetieren, trotz ihrer im Vergleich geringen Leberkapseldicke, nur der Leberrand untersucht werden kann. Aus diesem Grund können mit dieser Technik pro Versuchstier nur wenige Leberazini pro Versuchstier unter-

sucht werden. Zudem ist die Perfusion im Leberrandbereich bereits unter Normalbedingungen eingeschränkt, was die Aussagekraft der gefundenen Ergebnisse beschränkt (Eguchi et al., 1991). Mit Einführung der Epi-Illuminationstechnik und Fluoreszenzfarbstoffen machte die Intravitalmikroskopie als Untersuchungsmethode einen großen methodischen Fortschritt (Lehr et al., 1999). Diese Methode ermöglichte die Darstellung größerer und zentraler gelegener Leberareale und deren quantitative Auswertung (Menger et al., 1991). Sinusoide und postsinusoidale Venolen, die parallel zur Leberoberfläche verlaufen, können mittels Intravitalmikroskopie visualisiert werden und nach der 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-Interaktionen sowie die Phagozytoseaktivität von Kupffer-Stern-Zellen (Menger et al., 1991; Vollmar et al., 1996a). Die Besonderheit der Intravitalmikroskopie, pathologische Prozesse in ihrer Dynamik in situ und in Echtzeit visualisieren zu können, wurde besonders für Studien der hepatischen Mikrozirkulation genutzt. Hier können Arbeiten zur Endotoxinämie (Vollmar et al., 1993a), zur Ischämie/Reperfusion (Vollmar et al., 1994a), zum hämorrhagischen Schock und zur Sepsis (Vollmar, 1995), zum extrahepatischen Gallenwegsverschluss (Koeppel et al., 1997), zur Zirrhose (Vollmar et al., 1998), zur Leberregeneration (Cantré et al., 2008; Abshagen et al., 2006) sowie zum akuten septischen Leberversagen (Le Minh et al., 2006; Slotta et al., 2006; Eipel et al., 2007) beispielhaft aufgezählt werden. Damit stellt die auch in dieser Arbeit verwendete Intravitalmikroskopie eine wirkungsvolle und gut etablierte Untersuchungsmethode zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation dar (Vollmar und Menger, 2009).

Da die Anästhesie und operative Prozedur unvermeidliche Effekte auf die Hämodynamik und Leberintegrität haben (Thompson et al., 2002), wurden alle Versuchstiere strikt auf die gleiche Art und Weise präpariert, um Unterschiede zu minimieren. Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen innerhalb desselben genetischen Hintergrundes erfolgte zufällig.

Die adäquate Perfusion ist eine entscheidende Grundvoraussetzung für das Überleben von Gewebe sowie die Aufrechterhaltung dessen Funktion (Rücker et al., 1998). Die Untersuchung der Mikrozirkulation, in diesem Fall der sinusoidalen Perfusion, stellt einen entscheidenden Teil der Analyse von pathologischen Prozessen innerhalb der Entwicklung eines akuten Leberversagens dar. In dieser Studie wurde die Analyse der hepatischen sinusoidalen Perfusion mittel intravenöser Applikation von Natriumfluoreszein ermöglicht. In

diesem Verfahren bilden die ungefärbten Erythrozyten im Mikrovaskularraum den Negativkontrast zu den in den Hepatozyten befindlichem Fluoreszenzfarbstoff (Vollmar et al., 1994a). Die sinusoidale Perfusion ist anfällig für verschiedene Störeinflüsse, die während des Experiments unvermeidlich auftreten. Jedoch kann die Aussagekraft des ermittelten Parameters mit einer sinusoidalen Perfusion von um die 98 % in den Kontrollgruppen unterstrichen und als standardisierte Analyse der hepatischen Mikrozirkulation angesehen werden (Menger et al., 1991).

Die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des akuten Leberversagens (Vollmar et al., 1994b; Jaeschke und Smith, 1997; Eipel et al., 2004; Li et al., 2004; Jaeschke und Hasegawa, 2006). Die intrahepatische Leukozytenakkumulation sowie die Leukozyten-Endothellzell-Interaktion wurden *in vivo* untersucht und durch histochemische Analysen vervollständigt. Die intravenöse Applikation von Rhodamin 6G ermöglichte die *in vivo*-Färbung der Leukozyten und damit die intravitalmikroskopische Analyse ihrer Anzahl sowie ihrer schrittweisen Interaktionen mit dem hepatischen mikrovaskulären Endothel (Vollmar et al., 1994b).

Der apoptotische Zelltod nimmt in der Pathogenese der Sepsis und des damit assoziierten Organversagens eine große, wenn nicht entscheidende Rolle ein (Power et al., 2002). Demzufolge wurde in dieser Studie die Bedeutung der Apoptose bei der Entwicklung des akuten septischen Leberversagens untersucht. Die Analyse durch Bestimmung der cleaved Caspase-3, Procaspase-8 sowie cleaved Caspase-9 erfolgte immunhistochemisch sowie mittels Western Blot Analyse.

Einer anderen Art des Zelltods, der Nekrose, wurde lange die Hauptrolle in der Entwicklung des akuten Leberversagens zugeschrieben. In letzter Zeit erscheint die Nekrose jedoch mehr in der Begleiterrolle einer Apoptose, wobei auch ein zeitweise gemeinsamer Signalübertragungsweg diskutiert wird (Jaeschke et al., 2004). Unter bestimmten Bedingungen können Charakteristika sowohl der Nekrose als auch der Apoptose in einer Zelle auftreten (Ghavami et al., 2005). Als Maß für die nekrotische Zellschädigung, die unter anderem mit einer Membranschädigung einhergeht, wurden die Plasmaaktivitäten der Alanin-Aminotransferase (ALT), der Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie der Glutamatdehydrogenase (GLDH) ermittelt. Bei einer Leberzellschädigung sind die Aktivitäten der Transaminasen erhöht, wobei die Höhe des Enzymanstiegs mit dem Ausmaß der Leberzellschädigung korreliert. ALT

ist ausschließlich im Zytosol der Zellen vorhanden. Eine erhöhte Aktivität zytoplasmatischer Enzyme sind Folge einer Anoxie-bedingten Freisetzung, die neben dem Zelltod auch nach reversiblen Zellschädigungen auftreten kann (Nishimura et al., 1986; Kamiike et al., 1989). Durch die Bestimmung der Plasmaaktivität der ALT kann eine akute Zellschädigung der Leber nachgewiesen werden. Dagegen ist die AST sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien der Zellen vorhanden. Bei einer schwergradig gestörten hepatozellulären Integrität, wie z.B. der Zellnekrose, sind neben zytoplasmatischen auch mitochondriale Enzyme im Plasma erhöht nachweisbar. Somit kann durch die Bestimmung der plasmatischen Aktivität der AST das Ausmaß der hepatischen Nekrose und der Leberzellschädigung beurteilt werden. Die GLDH ist weitestgehend leberspezifisch, wobei sich das Enzym bei Hepatozyten ausschließlich in den Mitochondrien befindet. Eine Erhöhung der plasmatischen Aktivität der GLDH lässt auf eine schwere Leberzellschädigung mit Leberzelluntergang schließen.

Um das Ausmaß der Inflammation in den Versuchstieren abschätzen zu können, wurde die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 im Plasma bestimmt. Dieses Zytokin ist Teil der inflammatorischen Kaskade während der Sepsis und führt neben der Aktivierung der Neutrophilen, Lymphozyten und Endothelzellen auch zur Induktion von Prostaglandinen (Cohen, 2002). Des Weiteren wurde der plasmatische Gehalt an Malondialdehyd bestimmt, welches als Indikator für oxidativen Stress im Organismus gilt (Thérond et al., 2000; Alonso de Vega et al., 2002).

Ein alternatives Verfahren zur Beurteilung des Ausmaßes der Inflammation wäre unter anderem die Bestimmung des Myeloperoxidase-Gehalts im Lebergewebe. Dieses Enzym wird aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt und kann daher als Parameter für die Gewebeeinfiltration und Aktivierung von Neutrophilen herangezogen werden (He et al., 2007; Laschke et al., 2007). Des Weiteren kann zur Erfassung der Intensität der Inflammationsreaktion eine Bestimmung der Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) oder des Stickoxids (NO) durchgeführt werden, welche beide im Verlauf einer Inflammation erhöht nachweisbar sind (Escames et al., 2006).

Alternative Messmethoden zur Bestimmung des oxidativen Stresses in den Zellen im Vergleich zur Erfassung von MDA wären etwa auch die direkte Quantifizierung durch die Elektronen-Spin-Resonanz sowie weitere indirekte Methoden, wie die Bestimmung von Antioxidantien oder der totalen antioxidativen Kapazität. Des Weiteren stellen die Analysen von oxi-

dierten „Biomarkern“ wie 4-Hydroxynonenal, Isoprostan und oxidiertem LDL sowie die gaschromatographische Bewertung von DNA-Schädigungen Methoden zur Beurteilung des zellulären oxidativen Stress dar (Thérond et al., 2000), wobei alle im Hinblick auf die Sensitivität, Spezifität und das Zeitfenster der Analyse unterschiedliche Limitierungen aufweisen (Pincemail et al., 1996). Aufgrund der guten Handhabbarkeit und der lokalen Verfügbarkeit erfolgte bei der vorliegenden Arbeit die Bestimmung des plasmatischen Gehalts an Malondialdehyd als Lipidperoxidationsprodukt und Maß des oxidativen Stress und IL-6 als proinflammatorisches Zytokin.

Ziel der Studie war es den Einfluss einer Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 auf verschiedene pathophysiologische Vorgänge innerhalb des akuten septischen Leberversagens zu analysieren. Da das Genprodukt von ATP8 einen Teil der ATP-Synthase, eines Enzyms der Atmungskette, darstellt (Anderson et al., 1981), lässt sich eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels durch diese Genmutation vermuten. Da aktuelle Studien besagen, dass ein gestörter Energiestoffwechsel als Folge einer mitochondrialen Dysfunktion einen wichtigen Faktor im sepsisinduziertem Organversagen darstellt (Brealey et al., 2002; Brealey et al., 2004), ist die Analyse des hepatischen Energiestatus in dieser Arbeit von großem Interesse. Zur Beurteilung des metabolischen Energiestatus wurde der Gehalt an den verschiedenen energiereichen Phosphaten (AMP, ADP und ATP) im Lebergewebe der Versuchstiere mittels ATP-Assays bestimmt (Minor et al., 2001) und in Beziehung zueinander gesetzt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Das akute septische Leberversagen

Bei einer Sepsis kommt es im Organismus zur Aktivierung einer komplexen immuninflammatorischen Kaskade, während der Mechanismen der Entzündung, der Gerinnungsaktivierung, der Endotheldysfunktion sowie Mikrozirkulationsschädigungen in Wechselwirkung miteinander treten. Bei der Modulation der inflammatorischen Antwort auf infektiöse Stimuli kommt der Leber eine wichtige Funktion zu, obwohl die genaue Pathogenese der Leberdysfunktion im septischen Umfeld noch nicht vollständig geklärt ist (Weber et al., 2004). In einer Sepsis stellt die Leber nicht nur ein passives Ziel dar. Sie spielt auch eine aktive Rolle in der septischen Pathogenese sowie in der Regulation der resultierenden Abwehrreaktion

(Matuschak et al., 2001). Die Aktivierung des systemischen Inflammationssyndroms (SIRS) erfolgt zunächst durch die Aktivierung der Kupffer-Stern-Zellen, welche wiederum die hepatischen Endothelzellen aktivieren und zu einem Anstieg der intrahepatischen Akkumulation von aktivierten Leukozyten entscheidend beitragen. Die aktivierten Endothelzellen präsentieren nun verschiedene Adhäsionsmoleküle, z.B. E- und P-Selektin, welche die jeweiligen Rezeptoren auf der Oberfläche der aktivierten Leukozyten binden, woraus die endotheliale Leukozytenadhäsion resultiert. Für die Schädigung des Lebergewebes sind vor allem die Akkumulation und die Transmigration von aktivierten Leukozyten in das Leberparenchym verantwortlich (Jaeschke et al., 1996). Die innerhalb des Lebergewebes aktivierten Leukozyten haben die lokale und systemische Freisetzung einer Kaskade verschiedener Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6 etc.) zur Folge. Neben diesen Substanzen sorgen auch die freigesetzten Mediatoren Stickstoffmonoxid (NO) sowie die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) für eine eingeschränkte nutritive Perfusion, ein verringertes Sauerstoffangebot sowie eine verminderte Sauerstoffaufnahme, woraus ein gestörter intrazellulärer Sauerstoffmetabolismus resultiert. Am Ende dieser Aufeinanderfolge von pathophysiologischen Vorgängen stehen der Zelltod und unter Umständen das akute Leberversagen.

Beim akuten Leberversagen spielen proinflammatorische Zytokine eine kritische Rolle sowohl für das Auslösen als auch für das weitere Fortfahren der sehr komplexen und teilweise sich überlappenden pathologischen Prozesse. Eine systemische Inflammationsreaktion, die während eines akuten Leberversagens auftritt, ist am Voranschreiten der hepatischen Enzephalopathie beteiligt, was eine geringere Chance auf eine Transplantation zu Folge hat und zu einer schlechteren Prognose führt (Rolando et al., 2000). In dieser Studie wurde das Zytokin IL-6 untersucht, welches neben TNF- α eine zentrale Rolle für endotoxininduzierte Krankheiten einnimmt und in der experimentellen sowie klinischen Forschung bereits häufig Gegenstand von Untersuchungen war (Ulich et al., 1989). In der vorliegenden Studie konnte nach Induktion des akuten Leberversagens ein massiver Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration festgestellt werden, was für die Ausbildung einer massiven Inflammationsreaktion in den Versuchstieren spricht.

Neben den hohen Zytokinkonzentrationen führt eine D-GalN/LPS-Exposition zudem zu einer erhöhten intrahepatischen Akkumulation von Leukozyten, wie es in dieser Studie die Ergebnisse zum Leukozyten-„Rolling“ und zur –stase sowie die histochemisch nachgewiesene Anhäufung dieser Blutzellen im Leberparenchym zeigte. Es ist bekannt, dass Leukozyten eine

große Bedeutung für die Pathogenese des akuten Leberversagens haben (Vollmar et al., 1993a; Vollmar et al., 1994b; Vollmar et al., 1995a; Jaeschke et al., 1996; Jaeschke und Smith, 1997; Jaeschke und Hasegawa, 2006). Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ist ein Prozess, der schrittweise abläuft (Li et al., 2004). Am Anfang steht eine vorübergehende Interaktion der Zellen, die sich im „Rolling“ der Leukozyten an der Gefäßwand ausdrückt. Durch die Überexpression von Oberflächenmolekülen und die Freisetzung von chemotaktischen Stimuli kommt es zu einer dauerhaften Adhärenz und Transmigration in das Leberparenchym mit anschließender Gewebsschädigung. Das Leukozytenrolling und die Leukozytenadhäsion sind stark von der Existenz spezifischer Oberflächenmoleküle abhängig, deren Ausprägung durch proinflammatorische Zytokine, vor allem TNF- α , induziert wird (Mackey et al., 1993; Bajt et al., 2001; Wolf et al., 2001). Die Ausbildung der Leukozytenstase in den hepatischen Sinusoiden scheint dagegen mehr von mechanischen Aspekten als von spezifischen Adhäsionsmechanismen abzuhängen. So behindern geschwollene Endothel- und Kupffer-Stern-Zellen, die Vasokonstriktion der Sinusoide sowie eine eingeschränkte Verformbarkeit der Leukozyten deren Passage durch das Mikrogefäßsystem (Jaeschke und Smith, 1997; Jaeschke und Hasegawa, 2006). Im Zusammenhang damit zeigte eine Studie im Ischämie/Reperfusion-Modell, dass eine sinusoidale Leukozytenstase nicht zwangsläufig in ein Perfusionsversagen münden muss (Vollmar et al., 1996a). Therapeutische Strategien, welche die Intensität der Leukozytenaktivierung sowie Akkumulation im Lebergewebe reduzieren, ohne dabei eine Lähmung der Abwehrkräfte des Organismus auszulösen, werden als idealer Ansatz bei der Prävention sowie beim Management des Leukozyten-induzierten akuten Leberversagens angesehen (Jaeschke und Hasegawa, 2006). In der vorliegenden Studie zeigten alle Versuchstiere nach D-GalN/LPS-Exposition einen deutlichen Anstieg des Leukozytenrolling und der Leukozytenadhäsion sowie eine deutliche Zunahme der Infiltration im Leberparenchym, was für die Ausbildung eines akuten septischen Leberversagens spricht.

Ein weiterer wichtiger Pathomechanismus des akuten septischen Leberversagens ist die Störung der hepatischen Mikrozirkulation. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sechs Stunden nach D-GalN/LPS-Applikation ein schweres sinusoidales Perfusionsversagen bei den Versuchstieren vorlag. Die Aufgabe der Mikrozirkulation ist es, die von den Zellen benötigte Sauerstoffzufuhr für den gesamten Organismus sicherzustellen (Bateman et al., 2003). Die Perfusion des mikrovaskulären Netzwerkes wird durch ein komplexes Zusammenspiel von neuroendokrinen, parakrinen und mechanosensorischen Signalwegen reguliert (Ince, 2005). Ursachen für das Mikrozirkulationsversagen innerhalb eines inflammatorischen

Reaktionssyndroms sind die reduzierte Verformbarkeit der roten Blutkörperchen mit folgend gesteigener Blutviskosität, der Anstieg der aktivierten Neutrophilen in Folge der vermehrten Präsentation von Adhäsionsmolekülen, die Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Fibrinablagerungen und der Ausbildung von Mikrothromben sowie die Dysfunktion von vasculären autoregulatorischen Mechanismen (Spronk et al., 2004). Das Perfusionsversagen führt anschließend zur Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, welches eine tragende Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis und des septischen Multiorganversagens einnimmt (Fink, 2002; Ince, 2005).

Große Bedeutung beim Krankheitsgeschehen des akuten septischen Leberversagens wird dem Zelltod im geschädigten Organismus zugesprochen. Der Zelltod ist hierbei nicht bloß eine unerwünschte Folge während einer Infektion, sondern stellt vielmehr einen kontrollierten und modifizierbaren Prozess mit signifikantem Einfluss auf die Pathogenese von Krankheiten dar (Fink und Cookson, 2005). Bei der Betrachtung des Zelltodes wurde in der Vergangenheit grundsätzlich zwischen der Apoptose und der Nekrose unterschieden. Die Apoptose wird als aktiver und programmierter Prozess des autonomen Abbaus von Zellen gesehen, der das Auslösen einer Entzündungsreaktion vermeidet. Dagegen wird die Nekrose als passiver, unerwünschter Zelltod beschrieben, der mit einer unkontrollierten Freisetzung von inflammatorisch wirksamen Zellinhalten einhergeht (Lemasters, 1999; Jaeschke und Lemasters, 2003). Neuste Erkenntnisse sprechen dafür, dass beide Formen des Zelltodes häufig die Konsequenz derselben Einwirkungen sowie Signalübertragung sind (Lemasters, 1999). Apoptose und Nekrose in ihrer reinen Form stellen die beiden Extreme des kontinuierlich stattfindenden Zelltodes dar (Malhi et al., 2006). Eine sehr geringe Schädigung des Organismus betrifft nur eine geringe Anzahl Zellorganellen, z.B. die Mitochondrien, wodurch eine Erneuerung der geschädigten Organellen durch Autophagy initiiert wird und die Zelle überlebt (Rodriguez-Enriquez et al., 2006). Bei einer schwereren Schädigung sind dagegen deutlich mehr Mitochondrien betroffen, was die Apoptose der Zelle zur Folge hat. Ist die Schädigung der Zelle so massiv, dass die ATP-Produktion durch die Mitochondria zusammenbricht, resultiert ein massiver Abfall der energiereichen Phosphate mit anschließender Nekrose der Zelle (Exline und Crouser, 2008). Im akuten Leberversagen kann neben der Apoptose auch die Nekrose der Hepatozyten beobachtet werden (Jaeschke et al., 2004). Es ist gesichert, dass beide Formen des Zelltodes für die Pathophysiologie des akuten Leberversagens von Bedeutung sind (Lemasters, 1999; Malhi et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen diese Erkenntnisse. Die Induktion des akuten Leberversagens durch D-GalN/LPS-

Injektion hatte einen signifikanten Anstieg apoptotischer Hepatozyten in den Versuchstieren zur Folge. Des Weiteren konnte die zweite Hauptform des Zelltodes, die Nekrose, im geschädigten Lebergewebe nachgewiesen werden. Durch die gesteigerte Aktivität der Transaminasen und der Glutamatdehydrogenase, welche als Indikatoren für die hepatozelluläre Integrität dienen (Limdi und Hyde, 2003; Bauer et al., 2004), wurde indirekt ein hoher Anteil von nekrotischen Hepatozyten nachgewiesen.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie war der Anstieg des oxidativen Stresses nach Induktion des akuten septischen Leberversagens. Unter den Bedingungen einer Sepsis kommt es zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) (Schulze-Osthoff et al., 1992; Gutteridge und Mitchell, 1999). ROS stellen einen Hauptfaktor bei der Induktion der hepatozellulären Apoptose innerhalb einer endotoxämischen Leberschädigung dar (Lemasters, 1999), wobei sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Aktivierungsweg dieser Form des Zelltodes gefördert werden (Carmody und Cotter, 2001). Zudem können ROS als „second messenger“ agieren und somit Einfluss auf die zelluläre Signalübertragung nehmen und zum Beispiel die Genexpression beeinflussen (Macdonald et al., 2003; Nathan, 2003). So ist das freie Radikal Peroxynitrit in der Lage, die Expression von verschiedenen Proteinen, wie des intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1, des P-Selektins sowie IL-8 und NF- κ B zu verstärken und somit die proinflammatorischen Prozesse zu fördern (De Nigris et al., 2003; Szabo, 2003). Durch diese und andere Mechanismen tragen ROS maßgeblich zur Organschädigung während eines systemischen Inflammationssyndroms bei und repräsentieren somit einen entscheidenden Faktor für die Ausprägung des klinischen Verlaufs der Sepsis und für die Prognose der Patienten (Crimi et al., 2006). Ein erhöhtes Niveau an Lipidperoxidationsprodukten im Plasma während einer Sepsis geht mit einer erhöhten Inzidenz des Multiorganversagens sowie einer schlechteren Prognose einher (Ogilvie et al., 1991; Goode et al., 1995). Patienten, die eine Sepsis überlebten, zeigten ein höheres antioxidatives Potential als diejenigen, die an der Erkrankung verstarben (Cowley et al, 1996).

Die Mitochondrien sind nicht nur Entstehungsort, sondern auch das Hauptangriffsziel von ROS. Im Zustand des oxidativen Stress kommt es durch ROS zur Schädigung von mitochondrialen Proteinen, die zu einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit dieser Zellorganellen führen (Crouser et al., 2002; Kroemer et al., 2007). Der daraus resultierende gestörte Energiemetabolismus der Zelle, der hauptsächlich in den Mitochondrien stattfindet, wird als „cytopathic hypoxia“ bezeichnet (Fink, 1997). Während einer Sepsis konnte eine verminderte

Aktivität der Atmungskette beobachtet werden (Gellerich et al., 1999; Trumbeckaite et al., 2001; Crouser et al., 2002; Gellerich et al., 2002). Zudem wurde bei septischen Tiermodellen in verschiedenen Geweben ein erniedrigter ATP-Gehalt ermittelt (Mela et al., 1972; Llesuy et al., 1994; Mizobata et al., 1995; Kantrow, 1997; Brealey et al., 2002). Auch in klinischen Studien mit septischen Patienten konnte in Muskelbiopsien ein verminderter Gehalt an ATP im Gewebe nachgewiesen werden (Brealey et al., 2002; Fredriksson et al., 2006). In der vorliegenden Studie konnten Ergebnisse erzielt werden, die mit den zuvor genannten im Einklang stehen. Bei Versuchstieren beider genetischer Hintergründe kam es zu einem Abfall der ATP-Konzentration im Lebergewebe nach Induktion des akuten septischen Leberversagens, wobei dieser bei ATP8-Mutation deutlich geringer ausfiel. Da ein Einfluss des mitochondrialen Gens ATP8 auf den metabolischen Energiestatus während des akuten septischen Leberversagens in den ermittelten Ergebnissen deutlich sichtbar wurde, erfolgt dessen Diskussion gesondert im folgenden Abschnitt.

5.2.2 Die Bedeutung des mitochondrialen Gens ATP8 beim akuten septischen Leberversagen

Mit der Entdeckung der mitochondrialen DNA in den 60iger Jahren des 19. Jahrhunderts erschloss sich der Medizin ein neues Forschungsfeld. Mit der Weiterentwicklung der technischen Möglichkeiten gelang schließlich im Jahre 1981 die komplette Sequenzierung sowohl der Maus- (Bibb et al., 1981) als auch der Human-mtDNA (Anderson et al., 1981). Alle 13 Proteine, die durch die mtDNA kodiert werden, stellen Schlüsselkomponenten der Atmungskette dar (Larsson und Luft, 1999). Das mitochondriale Gen ATP8 kodiert für die Strukturkomponente A6L der ATP-Synthase (Anderson et al., 1981). Obwohl sich die Analyse der Struktur dieses Enzyms durch moderne Technik, wie die Elektronenmikroskopie (Rubinstein et al., 2003) weiterentwickeln konnte, ist bislang weder die genaue Lokalisation dieser Unter-einheit noch die vollständige Klärung ihrer Funktion gelungen (Nijtman et al., 1995; Devenish et al., 2008). Es wird vermutet, dass sich A6L im peripheren Stiel der ATP-Synthase befindet (Stephens et al., 2000; Stephens et al., 2003) und dort zur Stabilisierung des Enzyms während seiner Rotation beiträgt (Bateson et al., 1999). In einer aktuellen Studie konnte bei ATP8-mutierten Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren eine Beeinträchtigung ihres neuroendokrinen Stoffwechsels sowie eine gesteigerte Ängstlichkeit gezeigt werden (Gimsa et al., 2009). Die vorliegende Arbeit diente dazu, die Bedeutung des mitochondrialen

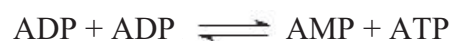
Gens ATP8 innerhalb des akuten septischen Leberversagens unter Verwendung eines Mausmodells zu erörtern.

Sowohl ATP8-kompetente als auch ATP8-mutierte Versuchstiere zeigten nach der Induktion des akuten septischen Leberversagens eine deutlich ausgeprägte Inflammationsreaktion. Die intravitalmikroskopischen Analysen zeigten bei Tieren beider genetischer Hintergründe einen etwa gleich starken Perfusionsabfall von bis zu 40% nach D-GalN/LPS-Applikation im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Die Ergebnisse des Leukozytenrollings und der Leukozytenadhärenz zeigten sich unabhängig von der ATP8-Mutation. Die ermittelten Plasmakonzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IL-6 sowie die erfasste Leukozyteninfiltration in das Lebergewebe führen ebenfalls zu dem Schluss, dass das Ausmaß der induzierten Inflammationsreaktion in beiden Versuchsgruppen etwa gleich groß war.

Bei der Bestimmung der Lipidoxidation als Indikator für den auftretenden oxidativen Stress konnte dagegen ein Einfluss des ATP8 Gens festgestellt werden. Die sechs Stunden nach der Applikation von D-GalN/LPS ermittelten Werte der ATP8-mutierten Tiere übertrafen die der ATP8-kompetenten Tiere um ~ 60 %. Reaktive Sauerstoffradikale, die während einer Sepsis im Organismus vermehrt gebildet werden (Schulze-Osthoff et al., 1992), tragen durch ihre schädigende Wirkung auf zelluläre Strukturen zur Pathogenese der Sepsis bei (Bayir und Kargan, 2008). Die gesteigerte Produktion von ROS bei ATP8-mutierten Tieren könnte auf das Fehlen der A6L-Untereinheit in der ATP-Synthase zurückzuführen sein. Es konnte gezeigt werden, dass eine defekte Atmungskette die Produktion von ROS begünstigt (Ozawa, 1997).

Die Mutation des ATP8 Gens zeigte bei der Analyse des hepatischen metabolischen Energiestatus der Versuchstiere einen klaren Einfluss auf die Ergebnisse. Einzig der Gesamtgehalt der Adeninnukleotide fiel bei beiden Versuchsgruppen identisch aus. In Situationen eines massiven Energiebedarfs vermindert sich durch die Hydrolyse der energiereichen Phosphate und den enzymatischen Abbau von AMP der Adeninnukleotidpool (Crumm et al., 2008), was auch unter den Bedingungen einer Sepsis nachgewiesen werden konnte (Illner und Shires, 1982). In beiden Versuchsgruppen der vorliegenden Studie konnte ein identischer Abfall des Adeninnukleotidpools nach Induktion des akuten Leberversagens festgestellt werden. Die auch in anderen Studien beobachtete ATP-Depletion unter septischen Bedingungen (Mela et al., 1972; Llesuy et al., 1994; Mizobata et al., 1995; Kantrow, 1997; Brealey et al., 2002) war bei ATP8-mutierten Tieren nur in abgeschwächter Form sichtbar. Als universelle Energieein-

heit ist ATP an allen Stoffwechselaktivitäten des Organismus beteiligt. In der besonderen Situation einer Sepsis kommt es zu einer Hochregulation des Stoffwechsels, was zu einer erhöhten Nachfrage an ATP führt. Im Gegensatz zu den Wildtypmäusen waren ATP8-defiziente Mäuse in der Lage, ihre ATP-Reserven im Zustand einer Sepsis aufrechtzuerhalten. Da der ATP-Gehalt allein nicht genug Aussagekraft über den metabolischen Zustand der Zelle bietet, wurde zusätzlich das ATP/ADP-Verhältnis bestimmt, welches als Indikator für den zellulären Energiestatus verwendet werden kann (Brealey et al., 2004; Crumm et al., 2008). Im Idealzustand herrscht in einer Zelle ein Energieüberschuss, d.h. die ATP-Reserven sind gesättigt, so dass das ATP/ADP-Verhältnis einen hohen Wert aufweist. Im Zustand eines vermehrten Energiebedarfs, z.B. während einer Sepsis, werden die ATP-Reserven aufgebraucht und es stellt sich ein Energiemangel ein, der durch ein niedrigeres ATP/ADP-Verhältnis gekennzeichnet ist. Interessanterweise weisen ATP8-mutierte Mäuse im Ruhezustand einen signifikant geringeres ATP/ADP-Verhältnis als die Wildtypmäuse auf. Nach Applikation von D-GalN/LPS, das heißt nach Induktion eines energetischen Stresszustandes, kam es zu erstaunlich gegensätzlichen Reaktionen der Versuchstiere. Die Wildtypmäuse zeigten nun einen deutlichen Abfall des ATP/ADP-Verhältnisses im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei den ATP8-mutierten Versuchstieren konnte dagegen eine klare Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses festgestellt werden, was eine Aufwertung des Energiestatus im Vergleich zu den Kontrolltieren suggeriert. Um diesen auffälligen Ergebnissen weiter auf den Grund gehen zu können, wurde die „mass action ratio“ der Adenylatkinasereaktion bestimmt, welche ein Maß für deren Aktivität darstellt. Die Adenylatkinase, welche ATP, ADP und AMP ineinander umwandelt ($\text{ADP} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$) ist in eukaryotischen Zellen sehr aktiv und hält die von ihr katalysierte Reaktion im Gleichgewicht (Hardie et al., 2001). Unter idealen Bedingungen halten gesunde Zellen ein bestimmtes ATP/ADP-Verhältnis aufrecht. In diesem Fall arbeitet die Adenylatkinase von rechts nach links und hält AMP niedrig.



Wenn ATPasen ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$) bedingt durch zellulären Stress mehr ATP verbrauchen als ATP-Synthasen produzieren können, fällt das ATP/ADP-Verhältnis ab und die Adenylatkinase arbeitet von links nach rechts und erzeugt AMP und ATP. Die in den Ergebnissen deutlich gewordene immense Aktivitätssteigerung der Adenylatkinase in ATP8-mutierten Tieren nach Induktion des akuten Lebersversagens spricht dafür, dass die Substrate das Reaktionsgleichgewicht verlassen (Crumm et al., 2008). Demgegenüber zeigten die Wildtypmäuse nur einen geringen Anstieg in der Enzymaktivität; die Reaktion kann leichter im

Gleichgewicht gehalten werden. Eine gesteigerte Aktivität der Adenylatkinase spricht für einen vermehrten Anfall von ADP. Da im Lebergewebe nach Induktion des akuten Leberversagens bei ATP8-Mutation aber im Vergleich zu Wildtyptieren geringe Konzentrationen von ADP und hohe Konzentrationen von ATP gefunden wurden, muss hier eine gesteigerte Aktivität der Atmungskette mit vermehrter ATP-Synthese angenommen werden. Diese enorm gesteigerte Aktivität der Atmungskette könnte auch als Ursache für die verhältnismäßig hohe Produktion von ROS und damit MDA-Bildung in Betracht gezogen werden, da diese als unvermeidbare Nebenprodukte während der ATP-Synthese entstehen (Muravchik und Levy, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die vom Gen ATP8 kodierte Untereinheit A6L der ATP-Synthase einen deutlichen Einfluss auf den hepatischen metabolischen Energiezustand während eines akuten septischen Leberversagens ausübt. Die Mutation des ATP8 Gens wirkt sich im Ruhezustand der Zelle gering negativ auf den Energiezustand aus, kehrt sich unter zellulärem Stress allerdings in einen deutlichen Vorteil um. Die im Vergleich deutlich aktivere Adenylatkinase der ATP8-mutierten Tiere führt zu einem höheren ATP/ADP-Verhältnis sowie zu höheren ATP-Konzentrationen im Gewebe, also einem besseren energetischen Zustand. Eine Erklärung dafür gestaltet sich sehr schwierig, da das Wissen über die Lokalisation sowie Funktion der A6L Untereinheit der ATP-Synthase noch sehr beschränkt ist.

Defekte der ATP-Synthase sind zwar seltener als bei anderen Enzymen der Atmungskette zu finden, erzeugen aber dafür durch die gestörte ATP-Synthese in den Zellen und die gesteigerte Produktion an ROS sehr schwerwiegende Folgen (Houstek et al., 2006; Mayr et al., 2004). Die ATP-Synthase besteht aus 14 kern- und zwei mitochondrial kodierten (ATP6 und ATP8) Untereinheiten, die bei Defekten der zugehörigen DNA-Abschnitte zu Funktionsstörungen des Enzyms führen. Genetisch verursachte Funktionsstörungen der ATP-Synthase lassen sich in quantitative und qualitative Störungen unterteilen. Quantitative Störungen sind durch einen verminderten Enzymgehalt in der Zelle charakterisiert. Die hierbei verantwortlichen Mutationen sind vermutlich nukleären Ursprungs und noch nicht sicher lokalisiert. Bei qualitativen Defekten sind die Struktur sowie die Funktion des Enzyms beeinträchtigt (Houstek et al., 2006). Der erste und mittlerweile gut erforschte qualitative Defekt der ATP-Synthase ist durch eine Mutation des mitochondrialen ATP6 Gens verursacht (Holt et al., 1990). Hierbei führt die T8993G Mutation zu einem Austausch von Leu¹⁵⁶ und Arg, die als Konsequenz die Ausbildung des NARP-Syndroms oder des Leigh Syndroms zur Folge hat (DiMauro und Schon, 2001). Die erste ATP8-Genmutation bei einem Menschen wurde im Jahre 2008 von *Jonckheere et al.* bei einem Patienten mit einer apikalen kardialen Hypertrophie und Neuropa-

thie entdeckt. Bei der gefundenen Nonsensemutation konnte eine verminderte Aktivität der ATP-Synthase beobachtet werden. Die Analysen zeigten einen verminderten Gehalt des Enzyms neben einem gesteigerten Gehalt an ihren Untereinheiten. Daraus konnte eine Relevanz der AL6 Untereinheit, welche von ATP8 kodiert wird, bei dem Zusammenbau des Enzyms abgeleitet werden. Zusätzlich wurde eine direkte Auswirkung der Untereinheit AL6 auf die Enzymaktivität vermutet (Jonckheere et al., 2008). Bereits bei Versuchen mit Hefe konnte für die korrespondierende Untereinheit Y8 eine bedeutende Rolle bei der Aktivitätsregulation der ATP-Synthase aufgezeigt werden (Devenish et al., 2000). Die hydrophoben Aminosäuren im Zentrum der transmembranösen Domäne von Y8 sind essentiell für die Kopplung des Protonentransports an die ATP-Synthase, wobei die Untereinheit Y8 wahrscheinlich bei der Konformationsänderung des Enzyms während der Katalyse ihre Wirkung entfaltet (Devenish et al., 2000). Diese Bedeutung der Untereinheit A6L bei der Regulation der Enzymaktivität könnte eine Erklärung für die Unterschiede im Energiestatus der Versuchstiere sein. Im Ruhezustand weisen die ATP8-mutierten Mäuse einen eingeschränkten Energiemetabolismus auf. Im Zustand des zellulären Stress nach Induktion des akuten Leberversagens kommt es zu einer im Vergleich zu Wildtypmäusen gegensätzlichen Reaktion, die Regulation der ATP-Synthase scheint massiv beeinträchtigt zu sein.

Die Forschungsgruppe um *Singer et al.* betrachtet die mitochondriale Dysfunktion innerhalb einer Sepsis aus einem anderen Blickwinkel (Singer et al., 2004). Die Erkenntnis, dass viele Organe innerhalb eines Multiorganversagens histologisch nahezu unauffällig waren und nur eine minimale Rate an Apoptose und Nekrose zeigten (Hotchkiss et al., 1999), führte zur Vermutung, dass der Defekt eher einen funktionellen als strukturellen Charakter aufweisen muss. Sie stellten die Hypothese auf, dass der Funktionsverlust von Organen unter diesen Umständen eine schützende Maßnahme des Organismus darstellt. Durch das Herunterfahren der mitochondrialen Aktivität und der daran gekoppelten ATP-Synthase wird ein in reduzierter Form stattfindender Zellmetabolismus eingeleitet, der mit einem „Winterschlaf der Zelle“ verglichen werden könnte (Singer et al., 2004). Die nun in verminderter Form ablaufende Atmungskette produziert weniger oxidativen Stress, der für die Mitochondrien sehr gefährlich ist, und ermöglicht der Zelle eine Erholungsphase, in der DNA-Reparaturen sowie eine mitochondriale Biogenese stattfinden können (Exline und Crouser, 2008). Da dieses Phänomen bei der ischämischen Herzkrankheit bereits gut erforscht ist, scheint das Auftreten dieses Mechanismus in der Pathophysiologie auch bei der Sepsis sehr plausibel (Brealey et al., 2004). Für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse würde das bedeuten, dass die gerin-

gere ATP-Konzentration in den Wildtypmäusen im Sinne eines Winterschlafs eine adäquate Reaktion auf die Schädigung darstellt. Die ATP-Synthese ist im Normalfall dem ATP-Bedarf angepasst. Essentielle Prozesse der Zellhomöostase werden aufrechterhalten, andere, nicht lebensnotwendige Prozesse hingegen heruntergefahren oder ganz eingestellt. Die durch diese Art und Weise eingesparte Energie dient der Zelle zur Erholung (Subramanian et al., 2007). Diese Strategie der „Neuprogrammierung“ der Zelle in Vitalorganen scheint bei einer milden Form der Sepsis durchaus eine effektive Strategie des Organismus darzustellen. Ist die mitochondriale Funktion der Zellen aber bereits vor der Infektion eingeschränkt, wie z.B. bei älteren Patienten, oder ist das Ausmaß der Infektion zu groß, so führt der akute Funktionsabfall der Mitochondrien unausweichlich in das Multiorganversagen (Exline und Crouser, 2008). Der in der vorliegenden Studie gefundene eingeschränkte Energiemetabolismus in den Wildtypmäusen könnte die Hypothese des „Winterschlafs der Zellen“ unterstützen. Für die ATP8-Mutation würde das bedeuten, dass durch das Fehlen der A6L Untereinheit der ATP-Synthase die Fähigkeit der Zellen in den schützenden „Winterschlaf“ zu fallen, eingeschränkt ist. Der im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöhte Gehalt an ATP unter septischen Bedingungen spricht gegen einen eingeschränkten Energiemetabolismus. Im Gegenteil: Die gesteigerte Aktivität der Adenylatkinase lässt auf eine Hochregulierung des Energiestoffwechsels unter diesen Bedingungen schließen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell simuliert die Pathogenese einer schweren Sepsis, bei welcher der sich „im Winterschlaf befindliche“ eingeschränkte Energiemetabolismus nicht die optimale Reaktion des Organismus darstellt (Exline und Crouser, 2008). Die erniedrigten Energiemetabolischen Folgen der ATP8-Mutation, d.h. die Hochregulation des Energiemetabolismus, könnten sich somit im akuten schweren Infektionsgeschehen als Vorteil erweisen.

Die Entscheidung, ob eine Zelle nach einer Schädigung den Zelltod mittels Apoptose oder Nekrose vollzieht, fällt maßgeblich durch den zellulären ATP-Gehalt. Da die Apoptose einen energiebedürftigen Prozess darstellt, gehen ausreichend hohe zelluläre ATP-Konzentrationen in der Regel mit dieser Form des Zelltodes einher. Übersteigt die ATP-Depletion unter den Bedingungen des zellulären Stresses ein bestimmtes Maß, resultiert der Zelltod mittels Nekrose (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997; Myoshi et al., 2006). Die vorliegende Studie konnte diese Ergebnisse bestätigen. ATP8-mutierte Tiere, die nach Induktion des akuten Leberversagens einen im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant höheren ATP-Spiegel aufwiesen, zeigten eine deutlich geringere Schädigung der hepatozellulären Integrität. Die ermittelten Plasmaaktivitäten, welche als Indikatoren für nekrotische Zellschädigung herangezogen

werden können, zeigten im Fall der AST und GLDH einen klar erkennbaren, bei der AST sogar signifikanten Unterschied zu den Werten der ATP8-kompetenten Tiere. Die verbesserte Aufrechterhaltung des idealen zellulären ATP-Levels scheint die ATP8-mutierten Mäuse bis zu einem gewissen Grad vor dem nekrotischen Zelltod zu schützen. In einer Studie mit UCP2 knock out Mäusen, welche für den entkoppelnd wirkenden Protonenkanal in der Atmungskette eine Defizienz aufweisen (siehe 1.3.1), konnte im Modell des akuten septischen Leberversagens ebenfalls eine verminderte nekrotische Zellschädigung in Folge eines verbesserten zellulären Energiestatus im Vergleich zu Wildtyptieren gezeigt werden (Le Minh et al., 2009).

Die Analyse der cleaved Caspase-3, die als am weitesten distal wirkende Effektorcaspase ein Indikator für die stattfindende Apoptose ist (Exline und Crouser, 2008), zeigte keinen erkennbaren Unterschied in den Versuchsgruppen. Die Procaspase 8 ist Teil des extrinsischen Aktivierungswegs der Apoptose, der unabhängig von den Mitochondrien ausgelöst wird (Susin et al., 1998; Lakhani et al., 2006). In der Western Blot Analyse der Procaspase-8 zeigten ATP8-mutierte Versuchstiere deutlich höhere Werte im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Dagegen erbrachte die Analyse der cleaved Caspase-9, welche einen Teil des intrinsischen Aktivierungswegs darstellt, deutlich erniedrigte Werte bei ATP8-mutierten Tieren. Obwohl verbindende Elemente zwischen dem extrinsischem und dem intrinsischem Aktivierungsweg der Apoptose bekannt sind (Scaffidi et al., 1998; Medema et al., 1998), wird primär letzterer durch die Mitochondrien vermittelt (Susin et al. 1999). Die erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass beim akuten septischen Leberversagen in ATP8-mutierten Tieren der intrinsische Aktivierungsweg der Apoptose im Vergleich zu Wildtypmäusen gedrosselt wird sowie der extrinsische Weg verstärkt abläuft. Die Addition der Aktivierungswege, welche beide final über die cleaved Caspase-3 verlaufen, ergibt letztendlich ein vergleichbares Ausmaß der Apoptose in Wildtypmäusen und Mutanten. Der verbesserte Energiestatus der ATP8-mutierten Versuchstiere führt daneben zu einer deutlichen Reduktion der Nekrose im Vergleich zu Wildtyptieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit aktuell veröffentlichten Studien, nach denen das Ausmaß der mitochondrialen Schädigung und der daran gekoppelte Energiestatus entscheidend für die Ausprägung des Zelltodes, von Autophagie der Organellen über Apoptose bis hin zur Nekrose ist (Exline und Crouser, 2008). Der verbesserte Energiestatus der Zellen scheint zudem einen Einfluss auf die Verteilung der apoptotischen Aktivierungswege zu haben.

In der Überlebensstudie zeigte die ATP8-Mutation einen Vorteil gegenüber den Wildtyptieren. Da das Ausmaß der Inflammationsreaktion nach Induktion des akuten septischen Leberversagens in beiden Versuchsgruppen etwa gleich groß war, scheint vor allem die akute Verminderung des nekrotischen Zelltods als Folge des verbesserten zellulären Energiestatus sowie der verbesserte Energiestatus an sich (Singer et al., 2004) Ursache der geringeren Mortalität zu sein. Der erhöhte oxidative Stress nach D-GalN/LPS-Applikation wirkt sich dagegen nicht negativ auf das Überleben der ATP8-mutierten Tiere aus. Bei der Ausbildung des akuten Leberversagens ist das Ausmaß des Zelltods von großer Bedeutung (Bauer et al., 2004). Die Leber ist eher in der Lage, mit einer moderaten Apoptose umzugehen als eine Schädigung durch Nekrose zu verarbeiten (Laurens et al., 2006). Die Ergebnisse dieser Studie fügen sich in die klinischen Erkenntnisse von Brealey et al., dass Patienten, die an einem septischen Schock verstarben, geringere ATP-Konzentrationen sowie ATP/ADP-Verhältnisse aufwiesen, als jene, die überlebten (Brealey et al., 2002).

5.3 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Bedeutung des mitochondrialen Gens ATP8 auf die Pathophysiologie des akuten septischen Leberversagens anhand eines Tiermodells zu untersuchen. Mittels der Intravitalmikroskopie, einer etablierten Untersuchungstechnik, konnten die pathophysiologischen Vorgänge der hepatischen Mikrozirkulation *in vivo* analysiert werden. Zur Unterstützung der *in vivo* Analysen wurden zudem biochemische, histologische, immunhistologische sowie molekularbiologische Untersuchungstechniken angewandt. Die vorliegenden Ergebnisse und deren anschließende Diskussion führen zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. Die intraperitoneale Applikation von D-GalN/LPS induziert in den Versuchstieren die Ausbildung eines akuten septischen Leberversagens, welches sich mit hohen systemischen Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, einer massiven Aktivierung und Akkumulation von Leukozyten in der Leber, einem starken hepatischen sinusoidalen Perfusionsausfall, einem vermehrten oxidativen Stress und vermehrter hepatozellulärer Apoptose sowie Nekrose manifestiert. Die Existenz des mitochondrialen Gens ATP8 hatte keinen Einfluss auf den Grad der Ausprägung der Inflammationsreaktion.

2. Die ATP8-Mutation zeigte einen Einfluss auf die Aktivierungswege der Apoptose. Unter den Bedingungen einer systemischen Inflammation kommt es durch die Mutation des ATP8 Gens zu einer Stärkung des extrinsischen und zu einer Schwächung des intrinsischen Aktivierungswegs. Die Gesamtrate der Apoptose blieb im Vergleich zu den Wildtypmäusen dagegen unverändert.
3. Die Atmungskette wurde funktionell durch die Ausbildung eines akuten septischen Lebersversagens stark beeinflusst. Im Einklang mit anderen Studien zeigten die Wildtypmäuse einen starken Abfall des metabolischen Energiestatus während der systemischen Inflammation. Ob dies eine Reaktion zum Selbstschutz des Organismus darstellt oder durch die zelluläre Schädigung akzidentiell verursacht wird, bleibt weiter zu diskutieren.
4. ATP8-mutierte Mäuse zeigten unter den Bedingungen einer Inflammation einen verbesserten Energiemetabolismus. Aufgrund einer deutlich vermehrten Aktivität der Atmungskette zeigten die Hepatozyten im Vergleich zu denen der Wildtypmäuse einen erheblich verbesserten Energiestatus. Möglicherweise fehlen ihnen regulatorische Eigenschaften der ATP-Synthase, die den Stoffwechsel in Form eines „Winterschlafs“ zum Selbstschutz nach einer Schädigung bremsen.
5. Der verbesserte Energiestatus der ATP8-mutierten Mäuse führte zu einer weniger ausgeprägten Nekrose. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit aktuellen Studien, die eine Abhängigkeit des Zellsterbens vom zellulären ATP-Gehalt aufzeigen.
6. Der verbesserte Energiestatus sowie die weniger ausgeprägte Nekrose führten bei ATP8-Mutation zu einer geringeren Mortalität in den Überlebensversuchen. Diese Ergebnisse bestätigen klinische Beobachtungen, dass Patienten mit erniedrigtem ATP-Gehalt im Gewebe eine höhere Mortalität aufweisen.

5.4 Perspektiven

Die vorliegende Studie konnte zeigen, welchen Einfluss ein einzelnes Gen auf den Pathomechanismus einer schwerwiegenden Erkrankung wie einer Sepsis haben kann. Obwohl

die genauen Mechanismen und Zusammenhänge unklar bleiben, konnte gezeigt werden, dass die Mutation des mitochondrialen Gens ATP8 im akuten Infektionsgeschehen einen Überlebensvorteil schafft.

Bei der Suche nach Ursachen von Erkrankungen rückt die mitochondriale Dysfunktion immer weiter in den Fokus. Bereits im Jahre 1962 wurde bei einem Patienten eine Krankheit mit mitochondrialer Ursache diagnostiziert, was zu einer Revolution in der chemischen Pathologie führte. Im Laufe der folgenden Jahrzehnte konnten bei einer stetig wachsenden Zahl von Patienten Dysfunktionen der Atmungskette als Ursache ihrer Erkrankung beschrieben werden. Heute sind mehr als 50 Krankheiten bekannt, die auf Mutationen der mtDNA zurückzuführen sind. Beispiele hierfür sind die Enzephalomyopathie (MNGIE), die progressive externe Ophthalmoplegie (adPEO) sowie die fatale infantile Myopathie (Larsson und Luft, 1999). Da es durch die Mutationen zu einer Beeinträchtigung des Energiemetabolismus kommt, sind meist Gewebe mit einem hohen Stoffwechselumsatz betroffen. Die Vielfalt an Krankheiten, die Mutationen im mitochondrialen Genom als Ursache haben, zeigt das Potential für die Forschung auf diesem Gebiet. Die Bedeutung der einzelnen Gene des mitochondrialen Genoms, wie auch des Gens ATP8 aufzuklären, kann einen Beitrag hierzu leisten.

Der Einfluss von genetischen Faktoren auf die Anfälligkeit des Organismus, an einer Infektion zu sterben, konnte in Studien nachgewiesen werden (Sörensen et al., 1988). Genetische Polymorphismen können die Physiologie vor oder während des Inflammationsgeschehen derart beeinflussen, dass das Risiko an einer Infektion zu erkranken, die Schwere der Erkrankung sowie die Wahrscheinlichkeit, an ihr zu versterben, zu einem großen Teil vom Erbgut prädisponiert sind (Lin und Albertson, 2004). Dieses Wissen kann helfen, neue Ansätze in der Therapie der septischen Erkrankungen zu entwickeln. Die Analyse des individuellen genetischen Risikoprofils würde eine gezielte, auf den Patienten abgestimmte Therapie ermöglichen und bessere Ergebnisse bei der Behandlung von septischen Erkrankungen für die Zukunft in Aussicht stellen.

Der Nachweis einer Mutation im mitochondrialen ATP8 Gens eines Menschen, die mit einer hypertrophischen Kardiomyopathie und Neuropathie einhergeht (Jonckheere et al., 2008), bildet die Brücke dieser experimentellen Arbeit zur klinischen Medizin. Mutationen des Genoms als Ursache für Erkrankungen oder als prädisponierende Faktoren für deren Verlauf stehen im Fokus der aktuellen Wissenschaft. Die Erforschung sowohl der durch Mutationen des mitochondrialen Genoms verursachten Erkrankungen als auch des genetischen Einflusses auf

den Verlauf der Sepsis stehen noch am Anfang und bieten für die Zukunft ein breites und interessantes Forschungsfeld.

6 REFERENZEN

1. Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res.* 2006;134(2):354-62.
2. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003;101(10):3765-77.
3. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001;7(3):167-202.
4. Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, Carbonell LF. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 2002;30(8):1782-6.
5. 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(4):924-32.
6. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
7. Angermüller S, Künstle G, Tiegs G. Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNFalpha-treated galactosamine-sensitized mice. *J Histochem Cytochem.* 1998;46(10):1175-83.
8. 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(7):1303-10.
9. Appoloni O, Dupont E, Vandercruys M, Andriens M, Duchateau J, Vincent JL. Association of tumor necrosis factor-2 allele with plasma tumor necrosis factor-alpha levels and mortality from septic shock. *Am J Med.* 2001;15;110(6):486-8.
10. Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol.* 1988;254(4 Pt 1):G471-6.
11. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(5):G1188-95.
12. Balk RA, Ely EW, Goyette RE: Sepsis Handbook. National Initiative in Sepsis Education. Vanderbilt University Medical Center, NISE 2001.
13. Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):56-65.
14. Barja G. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Radic Res Commun.* 1993;18(2):63-70.
15. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care.* 2003;7(5):359-73.
16. Bateson M, Devenish RJ, Nagley P, Prescott M. Single copies of subunits d, oligomycin-sensitivity conferring protein, and b are present in the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ATP synthase. *J Biol Chem.* 1999;274(11):7462-6.
17. Baue AE. Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome--where do we stand? *Shock.* 1994;2(6):385-97.
18. Bauer M. Molecular mechanisms of microcirculatory failure. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004;129(48):2594-6.

19. Bauer M, Paxian M, Kortgen A. Acute liver failure. Current aspects of diagnosis and therapy. *Anaesthesist*. 2004;53(6):511-30.
20. Bauer M, Winning J, Kortgen A. Liver failure. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2005;18(2):111-6.
21. Bayir H, Kagan VE. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*. 2008;12(1):206.
22. Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*. 1998;4(5):615-8.
23. Benjamim 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(7):3602-10.
24. Berkelhammer J, Oxenhandler RW, Hook RR Jr, Hennessy JM. Development of a new melanoma model in C57BL/6 mice. *Cancer Res*. 1982;42(8):3157-63.
25. 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(10):699-709.
26. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1997;336(13):912-8.
27. Berr F, Schiefke I, Vogel W. Leberversagen. *Medizinische Therapie 2005/2006*, 2. Auflage; Springer Berlin Heidelberg 2005. 860-70.
28. Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton DA. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. 1981;26(2 Pt 2):167-80.
29. Blier PR, Bothwell AL. The immune response to the hapten NP in C57BL/6 mice: insights into the structure of the B-cell repertoire. *Immunol Rev*. 1988;105:27-43.
30. 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(4):340-9.
31. Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermüller S, Tiegs G, Wendel A. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol*. 1996;149(4):1381-93.
32. Bolmsjö M, Hafström L, Hugander A, Persson B. Measurement of blood flow in rat liver with Xenon-133. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1983;2(1):27-37.
33. 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(6):1644-55.
34. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med*. 1989;17(5):389-93.
35. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112(1):235-43.
36. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;92(16):7162-6.

37. Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B. Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod.* 2006;21(3):610-7.
38. Boyer PD. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:717-49.
39. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002;360(9328):219-23.
40. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(3):R491-7.
41. Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 1995;369(2-3):136-9.
42. Brunkhorst FM. Epidemiology, economy and practice - results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet) *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2006;41(1):43-4.
43. Budelmann G. Hugo Schottmüller, 1867-1936. The problem of sepsis. *Internist (Berl).* 1969;10(3):92-101.
44. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 2003;7(3):249-57.
45. Cadenas S, Cadenas AM. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity. *Toxicology.* 2002;180(1):45-63.
46. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, Heumann D, Männel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med.* 2000;6(2):164-70.
47. Canter JA, Kallianpur AR, Parl FF, Millikan RC. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. *Cancer Res.* 2005;65(17):8028-33.
48. Cantré D, Schuett H, Hildebrandt A, Dold S, Menger MD, Vollmar B, Eipel C. Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *Br J Surg.* 2008;95(6):785-92.
49. Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep.* 2001;6(2):77-90.
50. Carré JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777(7-8):763-71.
51. Chadda K, Annane D. The use of corticosteroids in severe sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Ann Med.* 2002;34(7-8):582-9.
52. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, Hotchkiss RS. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J.* 2007;21(3):708-19.
53. Chaudry IH. Sepsis: lessons learned in the last century and future directions. *Arch Surg.* 1999;134(9):922-9.
54. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med.* 2003;9(3):338-42.
55. Clayton DA. Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inherit Metab Dis.* 1992;15(4):439-47.

56. Cobb JP, O'Keefe GE. Injury research in the genomic era. *Lancet*. 2004;19;363(9426):2076-83.
57. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
58. Cohen Y, Perronne C, Lazard T, Truffot-Pernot C, Grosset J, Vilde JL, Pocard JJ. Use of normal C57BL/6 mice with established *Mycobacterium avium* infections as an alternative model for evaluation of antibiotic activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(3):735-8.
59. Cook DJ, Reeve BK, Guyatt GH, Heyland DK, Griffith LE, Buckingham L, Tryba M. Stress ulcer prophylaxis in critically ill patients. Resolving discordant meta-analyses. *JAMA*. 1996;275(4):308-14.
60. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med*. 1996;24(7):1179-83.
61. Crerar-Gilbert AJ, Kyriacou PA, Jones DP, Langford RM. Assessment of photoplethysmographic signals for the determination of splanchnic oxygen saturation in humans. *Anaesthesia*. 2002 ;57(5):442-5.
62. Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, Napoli C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(3):398-406.
63. Cronin L, Cook DJ, Carlet J et al.: Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995; 23: 1430–1439.
64. Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med*. 2002;30(2):276-84.
65. Crouser ED, Julian MW, Dorinsky PM. Ileal VO(2)-O(2) alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1347-53.
66. Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Mandich DV, Green-Church KB. A proteomic analysis of liver mitochondria during acute endotoxemia. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1252-62.
67. Crumm S, Cofan M, Juskeviciute E, Hoek JB. Adenine nucleotide changes in the remnant liver: An early signal for regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*. 2008;48(3):898-908.
68. Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med*. 1999;5(7):788-92.
69. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*. 2006;86(1):9-22.
70. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S, Mari D, Mattace R, Franceschi C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J*. 1999;13(12):1532-6.
71. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998(1):1-11.
72. 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(3):858-73.
73. De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, De Clercq I, Eyskens F, Gerlo E, Smet J, Van Coster R. Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet*. 2004;41(2):120-4.
74. de Nigris F, Lerman A, Ignarro LJ, Williams-Ignarro S, Sica V, Baker AH, Lerman LO, Geng YJ, Napoli C. Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. *Trends Mol Med*. 2003(8):351-9.
75. Devenish RJ, Prescott M, Rodgers AJ. The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008;267:1-58.

76. Devenish RJ, Prescott M, Roucou X, Nagley P. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1458(2-3):428-42.
77. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet*. 2001 Spring;106(1):18-26.
78. Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS. Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology*. 1991(4):751-7.
79. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*. 1997;57(10):1835-40.
80. 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(4):330-9.
81. 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(5):G769-76.
82. 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(3):477-84.
83. Eipel C, Kidess E, Abshagen K, Leminh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoprotease protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*. 2007;151(3):406-13.
84. Endo Y, Shibasaki M, Yamaguchi K, Kai K, Sugawara S, Takada H, Kikuchi H, Kumagai K. Enhancement by galactosamine of lipopolysaccharide(LPS)-induced tumour necrosis factor production and lethality: its suppression by LPS pretreatment. *Br J Pharmacol*. 1999;128(1):5-12.
85. 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(7):1149-57.
86. Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res*. 2006;40(1):71-8.
87. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med*. 2004;32(5 Suppl):S219-22.
88. Evans T, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock*. 1993;41(2):77-81.
89. Exline MC, Crouser ED. Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure. *Front Biosci*. 2008;13:5030-41.
90. Fink MP. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1997;110:87-95.
91. Fink MP. Cytopathic hypoxia. A concept to explain organ dysfunction in sepsis. *Minerva Anesthesiol*. 2000;66(5):337-42.
92. Fink MP. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin*. 2001;17(1):219-37.
93. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care*. 2002;6(6):491-9.
94. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*. 1990;49(2):186-96.
95. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73(4):1907-16.

96. Flåring UB, Rooyackers OE, Wernerman J, Hammarqvist F. Temporal changes in muscle glutathione in ICU patients. *Intensive Care Med.* 2003;29(12):2193-8.
97. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 2000;182(1):41-9.
98. Fredriksson K, Hammarqvist F, Strigård K, Hultenby K, Ljungqvist O, Wernerman J, Rooyackers O. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(5):E1044-50.
99. Freise H, Brückner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. *J Invest Surg.* 200;14(4):195-212.
100. 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(6):2110-5.
101. Freudenberg MA, Keppler D, Galanos C. Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. *Infect Immun.* 1986;51(3):891-5.
102. Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(11):5939-43.
103. Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Hoshino H, Kato H. Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2005;116(2):91-100.
104. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med.* 2003;31(12):2742-51.
105. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, Zierz S, Müller-Werdan U, Werdan K, Redl H, Schlag G. Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. *Shock.* 1999;11(5):336-41.
106. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Gellerich JF, Chen Y, Neuhof C, Redl H, Werdan K, Zierz S. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci Rep.* 2002;22(1):99-113.
107. Genova ML, Pich MM, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(5):506-13.
108. Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit.* 2005;11(11):RA337-45.
109. Gimsa U, Kanitz E, Otten W, Ibrahim SM. Behavior and stress reactivity in mouse strains with mitochondrial DNA variations. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1153:131-8.
110. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1995;23(4):646-51.
111. Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology.* 1990;11(4):690-8.
112. Gray M., Burger G, Lang BF. Mitochondrial revolution. *Science* 1999;283:1476-81.
113. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305(5684):626-9.

114. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res.* 1962;22:842-9.
115. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005;54(7):1024-33.
116. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull.* 1999;55(1):49-75.
117. 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(5):1951-60.
118. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S21-7.
119. Hadikusumo RG, Meltzer S, Choo WM, Jean-François MJ, Linnane AW, Marzuki S. The definition of mitochondrial H⁺ ATPase assembly defects in mit- mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a monoclonal antibody to the enzyme complex as an assembly probe. *Biochim Biophys Acta.* 1988;933(1):212-22.
120. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997;15;414(3):552-6.
121. Han KH, Hashimoto N, Shimada K, Sekikawa M, Noda T, Yamauchi H, Hashimoto M, Chiji H, Topping DL, Fukushima M. Hepatoprotective effects of purple potato extract against D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(6):1432-7.
122. Hanon FX, Monnet DL, Sørensen TL, Mølbak K, Pedersen G, Schönheyder H. Survival of patients with bacteraemia in relation to initial empirical antimicrobial treatment. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(7):520-8.
123. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays.* 2001;23(12):1112-9.
124. 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(4):G1173-80.
125. Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med.* 2002;30(5 Suppl):S207-13.
126. Hoffmann JN, Fertmann JM, Schick K, Mauer M, Wirsching KC, Vollmar B, Menger MD, Jauch KW. Failure of microcirculation: diagnosis and therapeutic consequences. *Dtsch Med Wochenschr.* 2006;131(44):2489-92.
127. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest.* 2003;124(3):1103-15.
128. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 1990;46(3):428-33.
129. 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(9 Suppl):154S-159S.
130. Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Role of the innate immune response in sepsis. *Anaesthesist.* 2004;53(1):10-28.
131. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Karl IE. Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 7:S465-9.
132. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.

133. 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;7;96(25):14541-6.
134. Houstek J, Pícková A, Vojtísková A, Mráček T, Pecina P, Jesina P. Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(9-10):1400-5.
135. Huber-Lang MS, Younkin EM, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Curnutte JT, Erickson R, Ward PA. Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *J Immunol*. 2002;169(6):3223-31.
136. Illner H, Shires GT. Changes in sodium, potassium, and adenosine triphosphate contents of red blood cells in sepsis and septic shock. *Circ Shock*. 1982;9(3):259-67.
137. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 4:S13-9.
138. Jalan R, Olde Damink SW, Deutz NE, Hayes PC, Lee A. Restoration of cerebral blood flow autoregulation and reactivity to carbon dioxide in acute liver failure by moderate hypothermia. *Hepatology*. 2001;34(1):50-4.
139. Jalan R, O Damink SW, Deutz NE, Lee A, Hayes PC. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet*. 1999;354(9185):1164-8.
140. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci*. 2002;65(2):166-76.
141. Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int*. 2004;24(2):85-9.
142. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int*. 2006;26(8):912-9.
143. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1246-57.
144. Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol*. 1997;273(6 Pt 1):G1169-73.
145. Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;139(2):213-26.
146. 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(3):322-32.
147. Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans LG, van den Brand MA, Janssen AJ, Diepstra JH, van den Brandt FC, van den Heuvel LP, Hol FA, Hofste TG, Kapusta L, Dillmann U, Shamdeen MG, Smeitink JA, Rodenburg RJ. A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *J Med Genet*. 2008;45(3):129-33.
148. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(14):11199-203.
149. Kalman B. Role of mitochondria in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2006;6(3):244-52.
150. 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;15;185(3):265-70.
151. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys*. 1997;345(2):278-88.

152. Kapral C, Buder R, Binder M, Csillag C, Firlinger F, Gegenhuber A, Überall B, Wewalka F, Lenz K. Leberversagen bei Sepsis und Multiorganversagen. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*. 2005;3(2),7-12.
153. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, Volk HD, Doecke WD, Falke KJ, Gerlach H. Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):512-20.
154. Keller GA, Barke R, Harty JT, Humphrey E, Simmons RL. Decreased hepatic glutathione levels in septic shock. Predisposition of hepatocytes to oxidative stress: an experimental approach. *Arch Surg*. 1985;120(8):941-5.
155. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol*. 1968;9(2):279-90.
156. 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(2):71-7.
157. Khashab M, Tector AJ, Kwo PY. Epidemiology of acute liver failure. *Curr Gastroenterol Rep*. 2007;9(1):66-73.
158. 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(4):377-83.
159. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):463-70.
160. Klar E, Kraus T, Bredt M, Osswald B, Senninger N, Herfarth C, Otto G. First clinical realization of continuous monitoring of liver microcirculation after transplantation by thermodiffusion. *Transpl Int*. 1996;9 Suppl 1:S140-3.
161. 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(6):1065-72; discussion 1072-3.
162. 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(2):242-52.
163. Koepfel TA, Trauner M, Baas JC, Thies JC, Schlosser SF, Post S, Gebhard MM, Herfarth C, Boyer JL, Otto G. Extrahepatic biliary obstruction impairs microvascular perfusion and increases leukocyte adhesion in rat liver. *Hepatology*. 1997;26(5):1085-91.
164. Koike K. Animal models for sepsis. *Nippon Rinsho*. 2004;62(12):2262-6.
165. 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*. 2008;145(2):295-302.
166. Kreymann G, Wolf M. History and definition of sepsis--do we need new terminology? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 1996;31(1):9-14.
167. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:619-42.
168. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87(1):99-163.

169. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 2006;311(5762):847-51.
170. 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(2):168-74.
171. Larsson NG, Luft R. Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Lett*. 1999;455(3):199-202.
172. 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(5):G1396-402.
173. Laurens M, Scozzari G, Patrono D, St-Paul MC, Gugenheim J, Huet PM, Crenesse D. Warm ischemia-reperfusion injury is decreased by tacrolimus in steatotic rat liver. *Liver Transpl*. 2006;12(2):217-25.
174. Lebeau A, Frank J, Biesalski HK, Weiss G, Srai SK, Simpson RJ, McKie AT, Bahram S, Gilfillan S, Schümann K. Long-term sequelae of HFE deletion in C57BL/6 x 129/O1a mice, an animal model for hereditary haemochromatosis. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(8):603-12.
175. Lefering R, Neugebauer EA. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med*. 1995;23(7):1294-303.
176. Lehr HA, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells. *Methods Enzymol*. 1999;300:462-81.
177. 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(5):1220-34.
178. Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;9;236(1):1-9.
179. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997;185(8):1481-6.
180. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*. 1999;276(1 Pt 1):G1-6.
181. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):177-96.
182. Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(5):769-81.
183. 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(6):1954-63.
184. Le Minh K, Kuhla A, Abshagen K, Minor T, Stegemann J, Ibrahim S, Eipel C, Vollmar B. Uncoupling protein-2 deficiency provides protection in a murine model of endotoxemic acute liver failure. *Crit Care Med*. 2009;37(1):215-22.
185. Leone M, Bourgoin A, Cambon S, Dubuc M, Albanèse J, Martin C. Empirical antimicrobial therapy of septic shock patients: adequacy and impact on the outcome. *Crit Care Med*. 2003;31(2):462-7.
186. Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004;109(22):2698-704.

187. Levy E, Slusser RJ, Ruebner BH. Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. Electron microscopy. *Am J Pathol.* 1968;52(2):477-502.
188. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29(4):530-8.
189. Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(2):569-79.
190. 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(4):792-800.
191. Livingston DH, Deitch EA. Multiple organ failure: a common problem in surgical intensive care unit patients. *Ann Med.* 1995;27(1):13-20.
192. Li X, Klintman D, Weitz-Schmidt G, Schramm R, Thorlacius H. Lymphocyte function antigen-1 mediates leukocyte adhesion and subsequent liver damage in endotoxemic mice. *Br J Pharmacol.* 2004;141(4):709-16.
193. Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J.* 2003;79(932):307-12.
194. Llesuy S, Evelson P, González-Flecha B, Peralta J, Carreras MC, Poderoso JJ, Boveris A. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radic Biol Med.* 1994;16(4):445-51.
195. Löffler G. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, & Auflage; Springer Berlin Heidelberg* 2008. 167-181.
196. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun.* 2000;68(11):6398-401.
197. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth.* 2003;90(2):221-32.
198. Macdougall BR, Bailey RJ, Williams R. H2-receptor antagonists and antacids in the prevention of acute gastrointestinal haemorrhage in fulminant hepatic failure. Two controlled trials. *Lancet.* 1977;1(8012):617-9.
199. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med.* 1993;177(5):1277-86.
200. 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(6):505-11.
201. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S31-44.
202. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3-15.
203. 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 Suppl 1:1-6.
204. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546-54.
205. Martin TR. MIF mediation of sepsis. *Nat Med.* 2000;6(2):140-1.

206. 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(10):1245-52.
207. Matuschak GM, Henry KA, Johanns CA, Lechner AJ. Liver-lung interactions following *Escherichia coli* bacteremic sepsis and secondary hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(4):1002-9.
208. Mayr JA, Paul J, Pecina P, Kurnik P, Förster H, Fötschl U, Sperl W, Houstek J. Reduced respiratory control with ADP and changed pattern of respiratory chain enzymes as a result of selective deficiency of the mitochondrial ATP synthase. *Pediatr Res*. 2004;55(6):988-94.
209. McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat*. 1966;119(3):455-77.
210. Medema JP, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME. Bcl-xL acts downstream of caspase-8 activation by the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*. 1998;273(6):3388-93.
211. Mehendale HM. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol*. 2005;33(1):41-51.
212. Mela L, Bacalzo LV Jr, Miller LD. Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Physiol*. 1971;220(2):571-7.
213. 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(3-4):158-69.
214. 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(4):542-56.
215. Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K. Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1990;38(3):139-45.
216. Minor T, Hachenberg A, Tolba R, Pauleit D, Akbar S. Fibrinolytic preflush upon liver retrieval from non-heart beating donors to enhance postpreservation viability and energetic recovery upon reperfusion. *Transplantation*. 2001;71(12):1792-6.
217. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Peszynski P, Schmidt R, Nöldge-Schomburg G. Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12 Suppl 17:S75-82.
218. Miyoshi N, Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1727-31.
219. Mizobata Y, Prechek D, Rounds JD, Robinson V, Wilmore DW, Jacobs DO. The duration of infection modifies mitochondrial oxidative capacity in rat skeletal muscle. *J Surg Res*. 1995;59(1):165-73.
220. Moerer O, Burchardi H. Epidemiologie und Kosten der Sepsis. *kliniker* 2004; 33 (6): 177–180
221. Mohlke KL, Jackson AU, Scott LJ, Peck EC, Suh YD, Chines PS, Watanabe RM, Buchanan TA, Conneely KN, Erdos MR, Narisu N, Enloe S, Valle TT, Tuomilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS. Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Hum Genet*. 2005;118(2):245-54.
222. Moore K. Renal failure in acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(9):967-75.
223. Morava E, Rodenburg RJ, Hol F, de Vries M, Janssen A, van den Heuvel L, Nijtmans L, Smeitink J. Clinical and biochemical characteristics in patients with a high mutant load of the mitochondrial T8993G/C mutations. *Am J Med Genet A*. 2006;140(8):863-8.

224. Muravchick S, Levy RJ. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology*. 2006;105(4):819-37.
225. 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(3):734-8.
226. 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(45):652-6.
227. Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol*. 1963;19:593-611.
228. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest*. 2003;111(6):769-78.
229. Nathens AB, Marshall JC. Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name? *World J Surg*. 1996;20(4):386-91.
230. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl*. 2000;6(1):21-31.
231. Nijtmans LG, Klement P, Houstěk J, van den Bogert C. Assembly of mitochondrial ATP synthase in cultured human cells: implications for mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1272(3):190-8.
232. 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(4):701-7.
233. Nishio K, Iwamoto-Kihara A, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. Subunit rotation of ATP synthase embedded in membranes: a or beta subunit rotation relative to the c subunit ring. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13448-52.
234. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K Jr. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*. 1997;386(6622):299-302.
235. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*. 2001;15(6):879-92.
236. O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J*. 2005;81(953):148-54.
237. Ogilvie AC, Groeneveld AB, Straub JP, Thijs LG. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med*. 1991;17(1):40-4.
238. Opal SM, Esmon CT. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care*. 2003;7(1):23-38.
239. Opal SM, Glück T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med*. 2003;31(1 Suppl):S57-64.
240. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:143-83.
241. 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(2):77-9.
242. Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev*. 1997;77(2):425-64.

243. Pajkrt D, Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, van der Poll T, ten Cate JW, van Deventer SJ. Anti-inflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med.* 1996;184(5):1601-8.
244. Patzer JF 2nd, Block GD, Khanna A, Yin WY, Molmenti E, Gerber D, Kramer DJ, Scott VL, Aggarwal S, Wagner RA, Fulmer ML, Amiot BP, Mazariegos GV. D-galactosamine based canine acute liver failure model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2002;1(3):354-67.
245. Pincemail J, Defraigne JO, Limet R. Oxidative stress in clinical situations--fact or fiction? *Eur J Anaesthesiol.* 1996;13(3):219-34.
246. Porta F, Takala J, Weikert C, Bracht H, Kolarova A, Lauterburg BH, Borotto E, Jakob SM. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care.* 2006;10(4):R118.
247. Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet.* 2002;11(13):1581-3.
248. Power C, Fanning N, Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock.* 2002;18(3):197-211.
249. 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(4):325-32.
250. Protti A, Singer M. Oxidative stress and critical illness. *Minerva Anesthesiol.* 2007;73(5):255-7.
251. Qiu Z, Kwon AH, Tsuji K, Kamiyama Y, Okumura T, Hirao Y. Fibronectin prevents D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced lethal hepatic failure in mice. *Shock.* 2006;25(1):80-7.
252. Raffray M, Cohen GM. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol Ther.* 1997;75(3):153-77.
253. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999;282(1):54-61.
254. Rappaport AM. Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat.* 1977;(16 Pt 2):116-20.
255. Reinhart K, Brunkhorst FM. Sepsis. *Zentralbl Chir.* 2002;127(3):161-3.
256. Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stüber 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 Suppl 1:43-56.
257. Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock.* 2005;24 Suppl 1:7-11.
258. Renné T, Nieswandt B, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36(2):148-51.
259. Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care.* 2004;8(6):453-61.
260. Richardson D, Bellamy M. Intracranial hypertension in acute liver failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(1):23-7.

261. Richter C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* 1988;241(1-2):1-5.
262. Riedemann NC, Guo RF, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest.* 2002;110(1):101-8.
263. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 2003;9(5):517-24.
264. Rifai K, Bahr MJ. Acute liver failure. *Internist (Berl).* 2003;44(5):585-90, 592-8.
265. 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(2):136-41.
266. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):137-43.
267. Rodriguez-Enriquez S, Kim I, Currin RT, Lemasters JJ. Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy.* 2006;2(1):39-46.
268. Rolando N, Philpott-Howard J, Williams R. Bacterial and fungal infection in acute liver failure. *Semin Liver Dis.* 1996;16(4):389-402.
269. Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology.* 2000;32(4 Pt 1):734-9.
270. Rolfe DF und Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997; 77; 731-58.
271. Rosser DM, Manji M, Cooksley H, Bellingan G. Endotoxin reduces maximal oxygen consumption in hepatocytes independent of any hypoxic insult. *Intensive Care Med.* 1998;24(7):725-9.
272. Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulicier AM, Bouillaud F, Ricquier D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 1:S130-5.
273. Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J.* 2003;22(23):6182-92.
274. Rucker M, Binger T, Deltcheva K, Menger MD. Reduction of midfacial periosteal perfusion failure by subperiosteal versus supraperiosteal dissection. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(1):87-92.
275. Rucker M, Roesken F, Vollmar B, Menger MD. A novel approach for comparative study of periosteum, muscle, subcutis, and skin microcirculation by intravital fluorescence microscopy. *Microvasc Res.* 1998;56(1):30-42.
276. Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis.* 2008;28(2):167-74.
277. Santoro A, Mancini E, Ferramosca E, Faenza S. Liver support systems. *Contrib Nephrol.* 2007;156:396-404.
278. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science.* 1999;283(5407):1488-93.
279. Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K, Pascher A, Gruenwald A, Pless G, Irgang M, Kraemer M, Puhl G, Frank J, Müller AR, Steinmüller T, Denner J, Neuhaus P, Gerlach JC. Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation.* 2003;10(5):460-9.
280. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17(6):1675-87.

281. 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(7):1842-9.
282. Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int*. 2006;26(8):904-11.
283. Scheffler IE. Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;49(1-2):3-26.
284. Schneeweiss B, Pammer J, Ratheiser K, Schneider B, Madl C, Kramer L, Kranz A, Ferenci P, Druml W, Grimm G, et al. Energy metabolism in acute hepatic failure. *Gastroenterology*. 1993;105(5):1515-21.
285. 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(4):788-97.
286. Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998;136(1):17-24.
287. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem*. 1992;267(8):5317-23.
288. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(3):980-4.
289. Schwartz SM, Bennett MR. Death by any other name. *Am J Pathol*. 1995;147(2):229-34.
290. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):437-44.
291. Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M. Role of platelets in atherosclerosis and inflammation. *Med Klin (Munich)*. 2006;101(6):467-75.
292. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S441-8.
293. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 2004;364(9433):545-8.
294. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*. 1984;222(1):1-15.
295. Slotta JE, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) induce early hepatic injury, but provide a late window for protection against endotoxin-mediated liver damage. *J Hepatol*. 2006;44(3):576-85.
296. Smedegård G, Björk J, Arfors KE. An intravital microscopy model for studies of immune complex induced inflammation at the microvascular level. *Int J Tissue React*. 1985;7(1):55-60.
297. Sørensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med*. 1988;318(12):727-32.
298. 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(2):241-8.
299. Sperl W, Jesina P, Zeman J, Mayr JA, Demeirleir L, VanCoster R, Pícková A, Hansíková H, Houst'ková H, Krejčík Z, Koch J, Smet J, Muss W, Holme E, Houstek J. Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(12):821-9.
300. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*. 2004;8(6):462-8.

301. Stephens AN, Nagley P, Devenish RJ. Each yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase complex contains a single copy of subunit 8. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1607(2-3):181-9.
302. Stephens AN, Roucou X, Artika IM, Devenish RJ, Nagley P. Topology and proximity relationships of yeast mitochondrial ATP synthase subunit 8 determined by unique introduced cysteine residues. *Eur J Biochem*. 2000;267(21):6443-51.
303. Sterling RK, Luketic VA, Sanyal AJ, Shiffman ML. Treatment of fulminant hepatic failure with intravenous prostaglandin E1. *Liver Transpl Surg*. 1998;4(5):424-31.
304. Subramanian RM, Chandel N, Budinger GR, Schumacker PT. Hypoxic conformance of metabolism in primary rat hepatocytes: a model of hepatic hibernation. *Hepatology*. 2007;45(2):455-64.
305. Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):570-9.
306. Sundström E, Fredriksson A, Archer T. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. *Brain Res*. 1990;528(2):181-8.
307. Supinski GS, Callahan LA. Polyethylene glycol-superoxide dismutase prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(11):1240-7.
308. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397(6718):441-6.
309. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):151-65.
310. Sutherland DE, Numata M, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery*. 1977;82(1):124-32.
311. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 2003;140-141:105-12.
312. Takala J, Ruokonen E, Webster NR, Nielsen MS, Zandstra DF, Vundelinckx G, Hinds CJ. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *N Engl J Med*. 1999;341(11):785-92.
313. Tapalaga D, Tiegs G, Angermüller S. NFkappaB and caspase-3 activity in apoptotic hepatocytes of galactosamine-sensitized mice treated with TNFalpha. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(12):1599-609.
314. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci*. 1991;36(6):770-4.
315. Théron P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000;3(5):373-84.
316. Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG, Scheff SW. Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbital, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comp Med*. 2002;52(1):63-7.
317. Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Cemazar M, Shan S, Dewhirst MW, Barber PR, Vojnovic B, Chaplin DJ. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res*. 2001;61(17):6413-22.
318. Trampuz A, Zimmerli W. Pathogenese und Therapie der Sepsis. *Schweiz Med Forum*. 2003;35:811-18

319. Trumbeckaite S, Opalka JR, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN. Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. *Eur J Biochem.* 2001;268(5):1422-9.
320. Ulich TR, del Castillo J, Ni RX, Bikhazi N, Calvin L. Mechanisms of tumor necrosis factor alpha-induced lymphopenia, neutropenia, and biphasic neutrophilia: a study of lymphocyte recirculation and hematologic interactions of TNF alpha with endogenous mediators of leukocyte trafficking. *J Leukoc Biol.* 1989;45(2):155-67.
321. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1359-67.
322. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, Welsh-Bohmer KA, Saunders AM, Roses AD, Small GW, Schmechel DE, Murali Doraiswamy P, Gilbert JR, Haines JL, Vance JM, Pericak-Vance MA. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett.* 2004;365(1):28-32.
323. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003;72(4):804-11.
324. van Gestel A, Bakker J, Veraart CP, van Hout BA. Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Crit Care.* 2004;8(4):R153-62.
325. Vincent JL, Habib AM, Verdant C, Bruhn A. Sepsis diagnosis and management: work in progress. *Minerva Anesthesiol.* 2006;72(3):87-96.
326. Vladioianu IR, Dubini F. Experimental model of oral antityphoid vaccination with live streptomycin-dependent *Salmonella typhimurium* in C57BL/6 mice. *J Hyg (Lond).* 1975;75(2):215-8.
327. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Müller JM, Döcke WD, Kox WJ. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.* 1996;22 Suppl 4:S474-81.
328. Vollmar B. Mikrozirkulation und Sauerstoff-Versorgung der Leber bei hämorrhagischem Schock und Sepsis. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1995;30:S52-4.
329. 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(3):421-30.
330. Vollmar B, Eipel C, Menger MD. Organdysfunktion und gestörte Mikrozirkulation des septischen Patienten. *Viszeralchirurgie.* 2006;41:11-17.
331. 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(6):1421-31. (a)
332. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery.* 1995;117(2):195-200.(a)
333. Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K. Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir.* 1993;118(11):691-6.(a)
334. 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(3-4):282-5.

335. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1269-339.
336. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1994;267(5 Pt 1):G786-93.(b)
337. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol.* 1996;270(5 Pt 1):G798-803.(a)
338. Vollmar B, Rücker M, Menger MD. A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide H33342. *Microvasc Res.* 1996;51(2):250-9. (b)
339. Vollmar B, Senkel A, Menger MD. In vivo evidence that intercellular adhesion molecule-1 does not mediate endotoxin-induced hepatic leukocyte-endothelial cell interaction. *J Hepatol.* 1995;23(5):613-6.(b)
340. Vollmar B, Siegmund S, Menger MD. An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular derangements in developing cirrhosis in rats. *Hepatology.* 1998;27(6):1544-53.
341. 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(1):169-75. (b)
342. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 1999;66(1):10-24.
343. Walker RM, Racz WJ, McElligott TF. Acetaminophen-induced hepatotoxic congestion in mice. *Hepatology.* 198;5(2):233-40.
344. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 1999;283(5407):1482-8.
345. Walsh TS, Hopton P, Philips BJ, Mackenzie SJ, Lee A. The effect of N-acetylcysteine on oxygen transport and uptake in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 1998;27(5):1332-40.
346. Wang DN, Zhang WJ, Wu XF. The new antiendotoxin strategies. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2001;17(3):241-5.
347. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004;10(11):1216-21.
348. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(10 Pt 1):1768-73.
349. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001;15(22):2922-33.
350. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Péntzes I, Kübler A, Knaub S, Keinecke HO, Heinrichs H, Schindel F, Juers M, Bone RC, Opal SM; KyberSept Trial Study Group. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001;286(15):1869-78.
351. Weber SU, Schewe JC, Putensen C, Stüber F, Schröder S. Apoptosis as a pathomechanism in sepsis. : *Anaesthesist.* 2004;53(1):59-65.
352. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980;29(2):189-201.
353. 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 Suppl 2:52-5.

354. Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Küsters S, Fregien B, Trautwein C, Tiegs G. TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1--relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol.* 2001;166(2):1300-7.
355. Wu CC, Possible therapies of septic shock: based on animal studies and clinical trials. *Curr Pharm Des.* 2006;12(27):3535-41.
356. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
357. You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, Ju C. Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology.* 2006;44(6):1421-31.
358. Yu X, Gimsa U, Wester-Rosenlöf L, Kanitz E, Otten W, Kunz M, Ibrahim SM. Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res.* 2009;19(1):159-65.
359. 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(5):2300-9.
360. 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;82(4):894-905.
361. Zhou BR, Gumenscheimer M, Freudenberg M, Galanos C. A striking correlation between lethal activity and apoptotic DNA fragmentation of liver in response of D-galactosamine-sensitized mice to a non-lethal amount of lipopolysaccharide. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24(3):193-8.

7 LEBENS LAUF

Person

Name: Anke Hildebrandt
Geburtsdatum: 6. September 1983
Geburtsort: Ostseebad Kühlungsborn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, Tochter Juli Marie Madaus, geboren
am 27. November 2007
Anschrift: Babststr. 1, 18059 Rostock

Schulische Ausbildung

1990 – 1994 Grundschole Bad Doberan
1994 – 2003 Friderico-Francoisceum-Gymnasium zu Bad Doberan
2003 Allgemeine Hochschulreife mit der Note 1,0
2003 Ehrenmedaille des Landkreises Bad Doberan für das beste Abi-
tur des Jahrgangs 2003
2003 Buchpreis der Deutschen Physikalischen Gesellschaft 2003 für
besondere Leistungen im Fach Physik

Hochschulausbildung

2003 – 2010 Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
vorauss. 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Wissenschaftliche Tätigkeit

2003 – 2005 Redakteurin der ViaMedici-Online (Thieme Verlag)
seit 2005 Promotion am Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität
Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. B. Vollmar)

09/2008 bis 02/2009 Bearbeitung der Dissertation mit Zugang zur Lane Library der Stanford School of Medicine während eines Auslandsaufenthaltes in Palo Alto, Ca.

Publikationen

Originalarbeiten (per review):

1. Cantré D, Schuett H, **Hildebrandt A**, Dold S, Menger MD, Vollmar B, Eipel C. Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. Br J Surg 2008;95:785-92.
2. Eipel C, **Hildebrandt A**, Scholz B, Minor T, Kreikemeyer B, Ibrahim SM, Vollmar B. Mutation of mitochondrial ATP8 gene improves hepatic energy status in a murine model of acute endotoxemic liver failure (eingereicht).

Abstrakt (zitierfähig):

Scholz B, Eipel C, **Hildebrandt A**, Ibrahim S M, Minor T, Vollmar B. Mutation in the ATPase subunit-8 improves hepatic energy status in a model of acute liver failure. Langenbecks Arch Surg 2009;394:952.

Vortrag:

Teilnahme an den Chirurgischen Forschungstagen 2009 in München und Vortrag mit dem Titel: „Mutation innerhalb der ATP-Synthase Untereinheit-8 verbessert den hepatischen Energiestatus im murinen Modell des akuten Leberversagens“

Rostock, den 20. Oktober 2009

8 DANKSAGUNG

Ein besonderes Bedürfnis ist es, an dieser Stelle all denjenigen zu danken, die mich auf diesem langen Weg begleitet und zum erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, der Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie an der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an Ihrem Institut durchzuführen. Mit ihrem profunden Wissen stand sie mir vom Anfang bis zum Ende dieser Dissertation stets unterstützend zur Seite und war mit Ihren außerordentlichen Kenntnissen und wissenschaftlichen Fähigkeiten ein Garant für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit. Für die Möglichkeit an Kongessen teilzunehmen, bin ich sehr dankbar.

Herrn Professor Dr. med. Thomas Minor danke ich herzlich für die Bestimmung der ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen im Lebergewebe, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Großen Dank schulde ich auch Dr. rer. nat. Christian Eipel, war er doch über den gesamten Zeitraum meiner Dissertation ein geduldiger und hilfsbereiter Ansprechpartner. Durch sein naturwissenschaftliches Wesen hat er es mir nicht nur ermöglicht, die vielfältigen Aspekte der Forschung noch besser zu begreifen, er war mir zudem eine unverzichtbare menschliche Stütze auf unserem gemeinsamen Weg.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes bedanken, ohne deren Einsatz und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank geht vor allem an Dr. Hartmut Stein, Dr. Kerstin Abshagen, Maren Nerowski, Dorothea Frenz, Berit Blendow, Doris Butzlaff und Anja Gellert für die unermüdliche und stets freundliche Hilfe. Kathrin Sievert, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer danke ich sehr für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern danken, die mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Großer Dank gilt zudem meiner Großmutter Hannelore Friedrich, die mich während meines gesamten Studiums in jeder Hinsicht unterstützt hat. Ihr Glaube an mich und meinen Weg hat mir stets die notwendige Ruhe und Kraft geben kön-

nen. Ganz besonders dankbar bin ich meinem Lebensgefährten Dr. jur. Stephan Madaus, der stets die richtigen Worte für mich fand und neben unserer wundervollen Tochter Juli Marie als moralische Stütze zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

THESEN ZUR DISSERTATION

1. In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 75 000 Menschen an einer schweren Sepsis bzw. an einem septischen Schock. Mit ca. 60 000 Todesfällen stellen septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt und bösartigen Neubildungen dar.

2. Die Inflammationsreaktion während einer Sepsis besteht aus einer Kaskade noch nicht vollständig aufgeklärter pathophysiologischer Mechanismen, wie z. B. der Ausschüttung von Zytokinen, der Produktion von Sauerstoffradikalen, dem Mikrozirkulationsversagen sowie dem Zelluntergang, die in ihrer Summe in das letztendlich todesursächliche Multiorganversagen führen.

3. Die Leber kann als ein zentrales Organ beim septischen Schock und beim Multiorganversagen angesehen werden. Eine Störung der Leberfunktion wird bei 20 % – 25 % der Patienten im Rahmen einer schweren Inflammationsreaktion beobachtet. Kommt es im Rahmen einer Sepsis zur Ausbildung eines akuten Leberversagens ist die Prognose der Erkrankung sehr schlecht. Eine kausale Therapie des akuten Leberversagens ist bisher nicht etabliert.

4. Genetische Polymorphismen können die Pathophysiologie vor oder während des Inflammationsgeschehens derart beeinflussen, dass das Risiko, an einer Infektion zu erkranken, die Schwere der Erkrankung sowie die Wahrscheinlichkeit, an ihr zu versterben, zu einem großen Teil vom Erbgut prädisponiert sind.

5. Mitochondrien sind als Biogeneratoren der Zellen der Syntheseort des ATP, der universellen Energieeinheit des Organismus. Ein Nebenprodukt der in Mitochondrien ablaufenden Atmungskette stellen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dar, denen eine Bedeutung bei der Entwicklung des Zelltodes zugesprochen wird. In der jüngsten Vergangenheit konnte eine mitochondriale Beteiligung bei der Pathologie verschiedener Krankheiten aufgezeigt werden.

6. Die Sepsis verursacht eine mitochondriale Dysfunktion im Organismus, die einen eingeschränkten Energiemetabolismus zur Folge hat. Die Ausprägung der mitochondrialen Dysfunktion korreliert mit der klinischen Manifestation der Sepsis sowie der Art und Schwere des ablaufenden Zelltods.

7. In dieser Studie wurde unter Verwendung eines murinen Modells untersucht, inwieweit die Mutation des mitochondrialen Gens ATP8, das für eine Untereinheit der ATP-Synthase kodiert, den Verlauf des akuten septischen Leberversagens beeinflusst.
8. Die Mutation des ATP8-Gens hatte keine Auswirkung auf die Ausprägung der Inflamationsreaktion nach Induktion des akuten Leberversagens.
9. Die Induktion des akuten Leberversagens führte zu einem Anstieg in der ROS-Produktion, wobei dieser bei ATP8-Mutanten signifikant höher als bei Wildtyptieren ausfiel.
10. Die ATP8-Mutation bewirkte eine Verschiebung des intrinsischen und extrinsischen Aktivierungswegs der Apoptose im akuten Leberversagen, wobei sich in der Summe das Ausmaß der Apoptose in den ATP8-Mutanten nicht von dem in den Wildtyptieren unterschied.
11. ATP8-Mutanten waren im Zustand des akuten Leberversagens besser in der Lage, das energiemetabolische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Sie zeigten im Vergleich zu Wildtyptieren ein signifikant höheren Energiestatus der Leber sowie einen signifikant gesteigerten Substratumsatz im Energiemetabolismus.
12. Aufgrund des verbesserten Energiestatus erlitten ATP8-Mutanten einen signifikant geringeren Leberschaden, der wiederum zu einer tendenziell höheren Überlebenschance führte.
13. Ein ausgeglichener Energiemetabolismus ist für das „outcome“ septischer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung.
14. Die Mutation eines einzelnen Gens hat einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf des akuten septischen Leberversagens, was den Stellenwert des genetischen Polymorphismus in der Pathophysiologie der Sepsis unterstreicht.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, den 20.10.2009

Anke Hildebrandt