Aus dem
Institut für Experimentelle Chirurgie
Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Bedeutung der Kupfferzellen für die Vermittlung des Leberschadens bei Sepsis

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Hirschmann, Martin
aus Rostock
Rostock, Oktober 2010

Dekan Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0129-1

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
   Institut für Experimentelle Chirurgie
   Zentrale Versuchstierhaltung
   Medizinische Fakultät, Universität Rostock
   Schillingallee 69a
   18057 Rostock

2. Herr Prof. Dr. med. Ernst Klar,
   Chirurgische Klinik und Poliklinik
   Abteilung für Allgemeine, Thorax-,
   Gefäß- und Transplantationschirurgie
   Schillingallee 35
   18057 Rostock

3. Herr Prof. Dr. med. Stefan Maier
   Klinik und Poliklinik für Chirurgie
   Universität Greifswald
   Friedrich-Loeffler-Str. 23b
   17475 Greifswald

Tag der Verteidigung: 05.07.2011

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen 6

Zusammenfassung 8

Abstract 10

1 EINLEITUNG 11

2 THEORETISCHER HINTERGRUND 14

2.1 Infektion, Bakteriämie, Systemisches Inflammationssyndrom, Kompensatorisches Antiinflammationssyndrom und Sepsis 14

2.2 Erreger der Sepsis 15

2.3 Das Lipopolysaccharid 16

2.4 Pathophysiologie der bakteriellen Sepsis 18

2.4.1 Veränderungen der Hämorheologie 19

2.4.2 Dysfunktion der Vasomotorik 20

2.4.3 Endothelzellaktivierung und -dysfunktion 20

2.4.4 Zell-Zell-Interaktionen 21

2.5 Die durch gram-negative Bakterien ausgelöste Sepsis und die Rolle der Monozyten und Makrophagen 23

2.6 Rolle der Leber bei bakterieller Sepsis 24

2.7 Hepatozelluläre Apoptose und Nekrose 25

2.8 Die Kupfferzelle 27

2.9 Experimentelle Infektions- und Sepsismodelle 28

3 ZIEL DER STUDIE 31

4 MATERIAL UND METHODEN 32

4.1 Versuchstiere 32

4.2 Experimentelles Modell **32**

4.3 Anästhesie und chirurgische Technik **33**

4.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie **36**
4.4.1 Sinusoidales Perfusionsversagen 38
4.4.2 Parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz 39
4.4.3 Sinusoidale Leukozytenkinetik 41
4.4.4 Venuläre Leukozytenkinetik 42
4.4.5 Sinusoidale Makrophagen 44
4.4.6 Venuläre Phagozytose 47
4.4.7 Apoptotische Hepatozyten und Kolokalisation mit aktivierten Kupfferzellen 47
4.4.8 Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen mit Leukozyten 49

4.5 Vollblut- und Serumanalytik **51**
4.5.1 Hämatologische Parameter, arterielle Blutgase 51
4.5.2 Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Serum 51

4.6 Histologie und Immunhistochemie **52**
4.6.1 TUNEL-Analyse zum Nachweis der hepatozellulären Apoptose und ED1 als Makrophagenmarker 52
4.6.2 Auswertung der Schnittpräparate 53

4.7 Experimentelles Protokoll **53**
4.7.1 Versuchsgruppen 53
4.7.2 Versuchsablauf 54
4.7.3 Statistik 55

5 ERGEBNISSE **56**

5.1 Mikrozirkulation in der Leber **56**
5.1.1 Sinusoidales Perfusionsversagen 56
5.1.2 Gewebeoxygenierung (parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz) 57

5.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber **58**
5.2.1 Venuläre Leukozytenkinetik 58
5.2.2 Sinusoidale Leukozytenkinetik 59

5.3 Hepatozelluläre Apoptose **60**
5.3.1 Apoptotische Parenchymschäden in der Leber 60
5.3.2 Nachweis von apoptotischen Hepatozyten mit der TUNEL-Analyse 60

5.4 Kupfferzellen **61**
5.4.1 Phagozytoseleistung der Kupfferzellen und die zonale Verteilung in den Sinusoiden 61
5.4.2 Nachweis von Kupfferzellen mit der ED1-Färbung 63

5.5 Kolokalisation von apoptotischen Hepatozyten und Kupfferzellen **63**

5.6 Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen und Leukozyten **66**

5.7 Spezifische Enzyme im Serum **67**

6 DISKUSSION **69**

6.1 Diskussion von Material und Methoden **69**
6.1.1 Diskussion des Modells 69
6.1.2 Diskussion der Untersuchungsmethoden 72

6.2 Diskussion der Ergebnisse **77**

7 ZUSAMMENFASSUNG **83**

8 PERSPEKTIVE **85**

9 LITERATURVERZEICHNIS **88**

Thesen zur Dissertation 103

Lebenslauf 105

Danksagung 107

Eidesstattliche Erklärung 109

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CASP	Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis
CCD	Charge-Coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
CLP	Coecal ligation and puncture
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
$GdCl_3$	Gadolinium-Chlorid
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	high power field
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	mittlerer arterieller Druck (mean arterial pressure)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MODS	Multi Organ Dysfunction Syndrome
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Molekulargewicht
µl	Mikroliter

µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p_a	arterial pressure
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Polyethylen
PGE	Prostaglandin E
pH	potentia Hydrogenii
R-LPS	rough-LPS
r.E.	relative Einheit
rhAPC	rekombinantes humanes aktiviertes Protein C
S-LPS	smooth-LPS
SEM	Standard Error of the Mean
SIRS	Systemisches Inflammationssyndrom (Systemic Inflammatory Response Syndrom)
SRCR	cysteinreiche Scavengerrezeptoren (Scavenger receptor cysteine-rich)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UV	ultraviolett
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
W	Watt

Zusammenfassung

Es gibt Hinweise darauf, dass die hepatozelluläre Apoptose nicht nur durch zirkulierende Blutzellen, welche in der geschädigten Leber adhärieren, bedingt wird, sondern gleichzeitig zur Aufrechterhaltung der entzündlichen Zell-Zell-Interaktion beiträgt.

Da in früheren Studien bereits die besondere Rolle des zellulären „Crosstalks“ in der Vermittlung des Leberschadens belegt werden konnte, untersuchten wir hier die Bedeutung der Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen mit adhärenten Leukozyten und apoptotischen Hepatozyten.

Mittels der in vivo Fluoreszenzmikroskopie konten wir in Ratten 6h nach intraperitonealer sowie 16h nach intravenöser LPS-Exposition (10mg/kg) deutliche Zeichen einer Leberschädigung, wie sinusoidales Perfusionsversagen, Gewebehypoxie, Leukozytenakkumulation, Aktivierung von Kupfferzellen und hepatozelluläre Apoptose, feststellen.

Die detaillierte räumliche Analyse zeigte eine vermehrte Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen mit apoptotischen Hepatozyten (6h: 8,0 ± 4,5%; 16h: 5,4 ± 2,5%) unter der Annahme, dass die apoptotischen Hepatozyten deren Zell-Zell-Kontakt vermitteln. Dagegen war hier das Ausmaß der Kolokalisation deutlich geringer (6h: 1,3%; 16h: 0,9%) unter der Annahme, dass die aktivierten Kupfferzellen Vermittler der Zell-Zell-Kontakte sind. In der Kontrollgruppe traten keine Kolokalisationen auf.

Die Bestätigung dieser Interaktionen erfolgte histochemisch durch Färbung apoptotischer Hepatozyten und Kupfferzellen mittels ApopTag/TUNEL Analyse bzw. ED1-Makrophagenmarker.

Die Kolokalisation von Kupfferzellen und Leukozyten lag zwischen 4-5% und erhöhte sich nicht nach LPS-Exposition.

Zusammenfassend lassen die gewonnenen Ergebnisse den Schluss zu, dass der apoptotische Zelltod von Hepatozyten die Phagozytoseaktivität benachbarter Kupfferzellen stimuliert. Die konsekutive Freisetzung von Todessignalen durch die Kupfferzellen bewirkt vermutlich einen weiteren apoptotischen Zelluntergang, auch in Entfernung des Ursprungsereignisses.

Ein besseres Verständnis der Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen apoptotischer Vorgänge könnte eine gezielte Regulation des apoptotischen Zelltodes ermöglichen und so neue Therapieoptionen eröffnen.

Abstract

There is strong evidence that hepatocellular apoptosis is not only initiated by circulating blood cells which become adherent within the endotoxemic liver, but also contributes to further sustain the inflammatory cell-cell response. Because previous studies assume an important role of cellular crosstalk in mediating inflammatory liver injury, we herein examined activation of Kupffer cells (KCs) and their spatial coincidence with intrahepatic leukocyte adherence and hepatocellular apoptosis. Using *in vivo* multifluorescence microscopy, liver injury at 6h after intraperitoneal and 16h after intravenous exposure of rats with lipopolysaccharide (10mg/kg) comprised nutritive perfusion failure, tissue hypoxia, leukocyteaccumulation as well as KC activation and parenchymal apoptotic cell death. Detailed spatial analysis revealed frequent colocalization of activated KCs with apoptotic hepatocytes as denominator for interaction 6h (8.0 ± 4.5%) and 16h (5,4 ± 2,5%) after exposure, while the extent of colocalization indicating KCs as denominator for interaction was less than 1.3% 6h and 0,9% 16h after exposure. Colocalization was absent in saline-treated controls. Using histochemistry, colocalization was confirmed by ED1-positive KCs neighbouring and engulfing TUNEL-positive hepatocytes. Colocalization of KCs with leukocytes ranged between 4-5% and did not increase in endotoxemic animals. Taken together, the present results indicate that apoptotic hepatocyte death may stimulate phagocytosis by neighbouring KCs. The consecutive release of death signals by KCs most probably may induce further apoptotic cell death even distant of the initiating cellular event. With respect to the fundamental importance of cell apoptosis, improved knowledge of these cell-cell-interactions might allow the development of new therapeutic strategies through regulation of apoptotic cell death.

1 Einleitung

Unter einer Sepsis versteht man die Kombination einer Infektion mit dem Syndrom der systemischen entzündlichen Antwort („systemic inflammatory response syndrome“, SIRS). Diese Definition wurde 1991 von den Fachgesellschaften American College of Chest Physicians und Society of Critical Care Medicine aufgestellt (Bone et al., 1992). Bei dem Begriff Sepsis handelt es sich um einen sehr alten medizinischen Terminus. Er wurde bereits von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) eingeführt und leitet sich von dem Griechischen („faul machen“) ab.

Sepsis kann durch eine Infektion mit gram-negativen Bakterien, Pilzen und Viren bedingt werden. Sie kann auch in Abwesenheit einer erfassbaren bakteriellen Invasion verursacht werden. In diesen Fällen sind mikrobielle Toxine, teilweise gram-negative bakterielle Endotoxine und eine endogene Zytokinproduktion als Initiatoren und Mediatoren beteiligt (Sands et al., 1997; Wheller und Bernard, 1999).

In Deutschland erkranken jährlich ca. 75.000 Einwohner an einer schweren Sepsis bzw. einem septischem Schock und 79.000 an einer Sepsis. Die Sepsis ist die siebthäufigste Diagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen bei Entlassung aus dem Krankenhaus. Mit ca. 60.000 Todesfällen stellen septische Erkrankungen somit die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt, aber vor der Herzinsuffizienz dar (Brunkhorst und Reinhart, 2006).

Eine Therapie dieser gefürchteten Komplikationen von bakteriellen Infektionen ist schwierig und komplex (Tabelle 1), da sie durch körpereigene Mediatoren unterhalten werden. Sepsis und septischer Schock (Chaudry et al., 1977; Townsend et al., 1987) führen zu einer verminderten Leberdurchblutung. Dies hat einen raschen Abfall energiereicher Phosphate mit einer Hypoxie des Gewebes und einer nachfolgenden Organdysfunktion zur Folge (Hasselgren, 1987). Eine zunehmende Leberdysfunktion bewirkt eine erhöhte Mortalität bei multiplem Organversagen (Marshall et al., 1988). Dementsprechend weisen eine Reihe von klinischen Untersuchungen auf den Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der hepatischen Insuffizienz durch Endotoxinämie/Sepsis und einer erhöhten Mortalität hin (Eiseman, 1977; Polk und Shields, 1977; Cerra et al., 1979). Ischämie, Schock und Trauma bewirken eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmmukosa (Baker et al., 1988; Rush et

al., 1988), welche zur Resorption von Bakterienbestandteilen, wie Endotoxin, führt und deren Übertritt in die Blutstrombahn begünstigt (Moyer et al., 1981; Border et al., 1987; Redan et al., 1990). Die systemische Einschwemmung von Endotoxin bewirkt eine inflammatorische Antwort, welche als wesentliche Ursache der Entstehung des multiplen Organversagens angesehen wird (Siegel, 1991; Deitch, 1992). Die Leber, als das dem Darm direkt nachgeschaltete Organ, mit Hauptaufgabe der Elimination von Fremdmaterial (u.a. Bakterien, Endotoxin) durch ortsständige Makrophagen (Kupfferzellen), ist das primäre Zielorgan von Endotoxin nach Translokation aus dem Darm.

Im Wesentlichen sind zwei Mechanismen zu unterscheiden, welche ein akutes Leberversagen auslösen können. Dies ist zum einen eine direkte Schädigung z.B. durch Ischämie/Reperfusion und zum anderen eine indirekte Schädigung z.B. infolge einer Endotoxinämie im Rahmen eines Multiorganversagens, bei der die Primärläsion nicht die Leber betrifft.

Für die Genese des Endotoxin-induzierten Leberschadens wird ein komplexes Zusammenspiel von Pathomechanismen diskutiert. Hierzu zählen stimulierte Leukozyten (Unger und Reilly, 1986; Grisham et al., 1988) und Kupfferzellen (Arredondo und Kampschmidt, 1963) mit ihrer Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Bautista et al., 1990; Decker, 1990), Cytokinen (Weissmann et al., 1980) und Arachidonsäuremetaboliten (Keppler et al., 1985), welche das mikrovaskuläre Endothel (Pober, 1988) sowie weitere Leukozyten (Pohlman et al., 1986) aktivieren und somit einen circulus vitiosus unterhalten. Dies führt zu einer zunehmenden Störung der Mikrozirkulation mit Destruktion des Endothels und interstitieller Ödembildung und vermittelt somit die Hepatotoxizität mit Gewebeschaden.

Ansätze der Therapie bei Endotoxinämie sollten auf der Erkenntnis der initialen Triggerfunktion von Endotoxin bezüglich der Aktivierung verschiedener zellulärer und humoraler Systeme beruhen. Experimentelle Ansätze beinhalten die Applikation monoklonaler Antikörper gegen Oberflächen-Adhäsionsmoleküle, welche die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion vermitteln, die Applikation spezifischer Antikörper bzw. Synthese-Inhibitoren inflammatorischer Mediatoren, die Modulation der Kupfferzellfunktion sowie die Elimination zirkulierenden Endotoxins.

Das Ziel dieser Arbeit ist es zur Erweiterung des Verständnisses der zellulären Kommunikation im Prozess der LPS-induzierten hepatozellulären Apoptose beizutragen.

Kausale Therapie	**Supportive Therapie**
Antimikrobielle Therapie - Antibiogramm - Antibiotika Fokussanierung - Drainage von Abszessen - Wunderöffnung und Nekrektomie - Amputation und Fasziotomie - Operative Behandlung von Peritonitis	Kreislauftherapie Ernährungstherapie Sedierung und Analgesie Insulintherapie Apparative Infusionstherapie Akutdialyse Künstliche Beatmung Thromboseprophylaxe
Adjunktive Therapie	**Pflegerische Maßnahmen**
Glukokortikosteroide Rekombinantes aktiviertes Protein C Antithrombin Immunglobuline - intravenös verabreichtes Immunglobulin G - intravenös verabreichtes IgM angereichertes Immunglobulin Selen Ibuprofen Wachstumshormone andere adjunktive Therapieansätze - Prostaglandine - Pentoxifyllin, - hochdosiertes N-Acetylcystein - Granulocyte-colony stimulating factor - Plasmapherese - Hämofiltrationsverfahren	febrile Infektion bei Risikopatienten - Blutdruck - Herzfrequenz und –rhythmus - Atemfrequenz ggf. Blutgasanalyse - Körpertemperatur - Urinproduktion - Laktat - Leber- und Nierenwerte - Elektrolyte - Gerinnung zusätzlich bei Sepsismanifestation - zentraler Venendruck - regelmäßige Blutgasanalyse, Pulsoxymetrie - Säure-Base-Haushalt - Blasenverweilkatheter zusätzlich bei septischem Schock - Pulmonalarterienkatheter - intraarterielle Blutdruckmessung

Tabelle 1: *Therapieformen und Maßnahmen bei der Sepsis, vereinfachte Darstellung nach Empfehlungen der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Leitlinien/Sepsis-Leitlinien?sid=8CbQVo2SyjBqHJwFaALzO0&iid=1)*

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Infektion, Bakteriämie, Systemisches Inflammationssyndrom, Kompensatorisches Antiinflammationssyndrom und Sepsis

Die Infektion ist definiert als pathologischer Prozess, hervorgerufen durch die Besiedlung normalerweise steriler Gewebe, Flüssigkeiten oder Körperhöhlen durch pathogene oder potentiell pathogene Mikroorganismen. Als Bakteriämie bezeichnet man das zeitweise Vorhandensein von Bakterien im Blut.

Das Kompensatorische Antiinflammationssyndrom (CARS) ist die überkompensierte Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren bei einer Infektion oder einem Trauma mit resultierender Immunsuppression, welche das Risiko einer Sekundär- bzw. Superinfektion erhöht.

Das Systemische Inflammationssyndrom (SIRS) wird diagnostiziert, wenn Patienten mehr als eines der folgenden klinischen Zeichen zeigen: Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C, Herzfrequenz > 90 min^{-1}, Hyperventilation verursacht durch Atemfrequenz > 20 min^{-1} oder p_aCO_2 < 32 mmHg, und Zahl der weißen Blutzellen > 12.000 Zellen/µl, < 4.000 Zellen/µl oder > 10% unreifer Formen.
Die Sepsis ist definiert als ein klinisches Syndrom, charakterisiert durch die Anwesenheit einer Infektion mit einer systemisch entzündlichen Antwort. Die klinische Manifestation beinhaltet 2 oder mehr der folgenden Bedingungen als Ergebnis der ablaufenden Infektion: Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C, Herzfrequenz > 90 min^{-1}, Hyperventilation verursacht durch Atemfrequenz >20 min^{-1} oder p_aCO_2 < 32 mmHg, und Zahl der weißen Blutzellen > 12.000 Zellen/µl, < 4.000 Zellen/µl, oder > 10% unreifer Formen (Bone et al., 1992).

Treten bei der Sepsis zusätzlich Organdysfunktionen auf, wird von einer „schweren Sepsis“ gesprochen. Ein Septischer Schock liegt bei zusätzlicher Hypotonie (systolisch < 90 mmHg, oder 40 mmHg niedriger als der Ausgangswert) trotz Flüssigkeitszufuhr in Verbindung mit Perfusionsstörungen vor (Cohen und Glauser, 1991).
Die Sepsis wird von Schuster und Werdan als die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen (Abbildung 1) und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime

und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren sowie die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen, definiert (Schuster und Müller-Werdan, 2005).

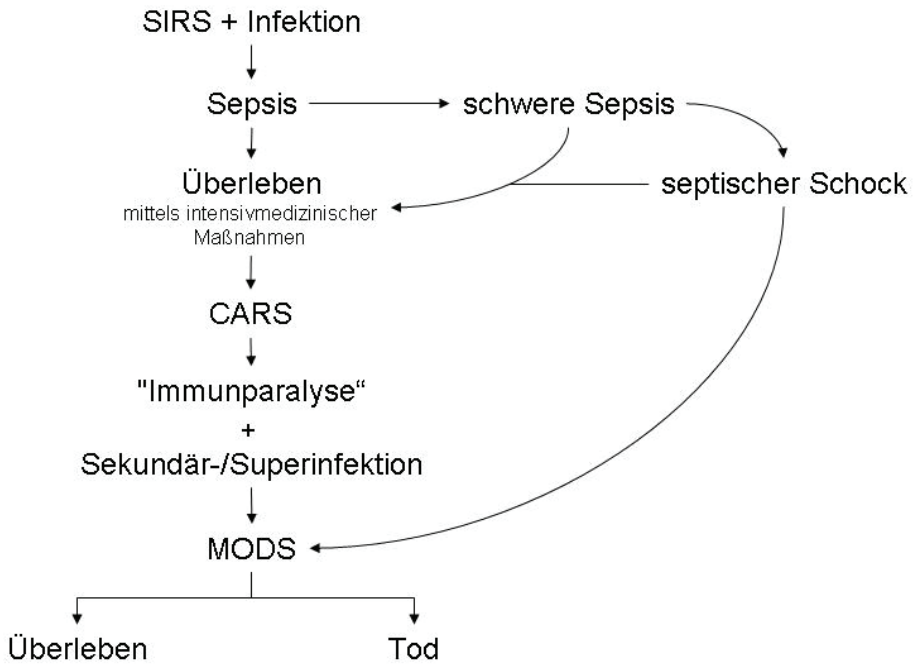


Abbildung 1: *Vereinfachte Darstellung der Abläufe im septischen Geschehen*

2.2 Erreger der Sepsis

Eine Sepsis kann durch Bakterien, Viren oder Pilze ausgelöst werden. Unter den in Blutkulturen nachgewiesenen Erregern dominieren in Mitteleuropa die Bakterien. Dabei sind gram-negative und gram-positive Erreger zu etwa gleichen Teilen vertreten. Etwa 10% der Bakteriämien sind polymikrobiell. Candida Spezies. finden sich in etwa 3% der Fälle. Die häufigsten Erreger sind Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Koagulase-negative Staphylokokken, Enterokokken, Klebsiellen und Pseudomonas Spezies (Brun-Buisson et al., 1995; Geerdes et al., 1992).

Bakterien setzen eine Vielzahl von Toxinen frei. Man unterscheidet Exotoxine, welche aktiv von den Erregern sezerniert werden, von Endotoxinen. Letztere werden besonders nach Destruktion der Bakterien frei und führen durch Immunstimulation und Zytokinfreisetzung zur Entstehung einer Sepsis bzw. Septischen Schock. Zu den Endotoxinen gehören Peptidoglykan und Lipoteichonsäure aus der gram-positiven Zellwand (Kessler et al., 1991; Kengatharan, 1998) sowie das Endotoxin oder Lipopolysaccharid (LPS), welches ein Hauptbestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien ist und als auslösendes Agens der gram-negativen Sepsis identifiziert wurde (Rietschel et al., 1994). Bei Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi wurden ähnliche Faktoren nachgewiesen (Randolf et al., 1995).

2.3 Das Lipopolysaccharid

LPS ist ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien. Das Aufbauprinzip ist bei verschiedenen Bakterienspezies identisch. Das klassische LPS besteht aus einem O-Antigen, einem Kernpolysaccharid (Core Region) und dem Lipid A (Raetz, 1990; Rietschel et al., 1994) (Abbildung 2).

Abbildung 2: *Allgemeiner Aufbau von LPS*

Das außen liegende O-Antigen ist ein Polymer aus sich wiederholenden Oligosacchariden. Es besitzt antigenen Charakter, ist bei jeder Bakterienspezies verschieden und kann somit der Differenzierung verschiedener Serotypen dienen (Popoff et al., 1998). Das O-Antigen kann jedoch vollständig fehlen. Diese LPS-Art wird „rough-LPS“ (R-LPS) genannt. Bei Anwesenheit eines O-Antigens spricht man von „smooth-Antigen“ (S-LPS) (Raetz, 1990).

Das Kernpolysaccharid ist bei vielen gram-negativen Bakterien identisch aufgebaut. Es liegt proximal des O-Antigens und wird in einen äußeren und einen inneren Kern unterteilt. Im inneren Kern des Kernpolysaccharides befindet sich immer Ketodesoxyoktonat. Es ist für die Funktion der äußeren Zellmembran unerläßlich und sein Verlust ist mit dem Leben gram-negativer Bakterien nicht vereinbar (Raetz, 1990).

Der kovalent gebundene Lipidanteil des LPS, das amphiphile Lipid A (Abbildung 3), dient als Membrananker und ist für die meisten pathophysiologischen Wirkungen des LPS verantwortlich (Loppnow et al., 1986; Rietschel et al., 1994). Es dient der Interaktion zwischen LPS und dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) und der Interaktion mit Lipoproteinen sowie der Aktivierung des Komplementsystems (Schumann et al., 1994; Freudenberg et al., 1991; Ihara et al., 1982). Bei der Vermehrung und dem Sterben gram-negativer Bakterien wird LPS und somit Lipid A frei (Freudenberg et al., 1991). Dieses stimuliert nun mit Hilfe bestimmter Plasmafaktoren unter anderem Granulozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen zur Produktion von Mediatoren. Diese induzieren die typischen Endotoxineffekte wie Akute-Phase–Reaktion, Blutdruckabfall, Verbrauchskoagulopathie sowie Schock und können somit eine Sepsis bewirken.

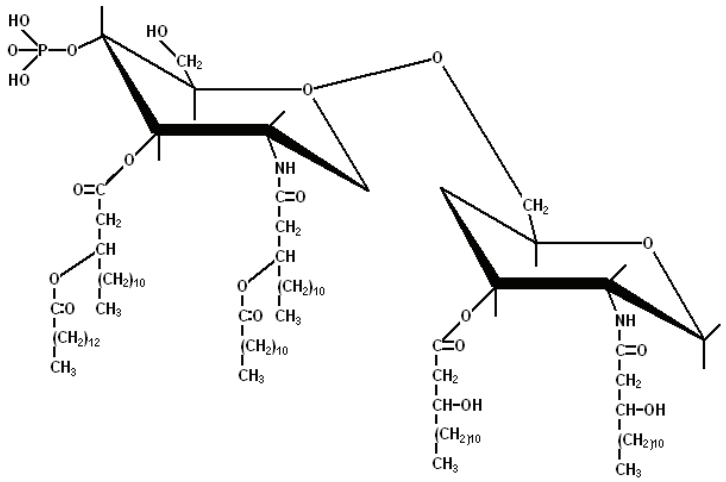


Abbildung 3: *Struktur der Lipid A-Untereinheit aus LPS von Enterobacteriaceae*

2.4 Pathophysiologie der bakteriellen Sepsis

Das klinische Bild der Sepsis resultiert aus der überschießenden systemischen Entzündungsantwort des Körpers auf eine Infektion. Kann der anfänglich lokal begrenzte entzündliche Fokus nicht kontrolliert werden, so führt dies letztlich in der Sepsis zu einem Zustand unkontrollierter, sich selbst unterhaltender intravaskulärer Inflammation, einem Verlust der Homöostase zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalwegen. Als initiale Stimuli agieren unter anderem bakterielle Zellwandbestandteile und Exotoxine. An den komplexen pathophysiologischen Vorgängen, die schließlich zur Entwicklung des septischen Krankheitsprozesses führen, sind eine Vielzahl an Komponenten der zellulären und humoralen körpereigenen Abwehr, zahlreiche Signalkaskaden und Mediatorsysteme beteiligt. Hierzu zählen immunkompetente Zellen wie Monozyten/Makrophagen, polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, die Kaskaden des Gerinnungssystems und der Fibrinolyse, Komplementfaktoren sowie multiple Zytokine und Mediatoren. Im zeitlichen Verlauf der Sepsis kommt es zu einem Wechsel vom Zustand massiver Aktivierung proinflammatorischer Kaskaden hin zu einem Überwiegen antiinflammatorischer Signalwege (Hotchkiss und Karl, 2002).

Von besonderer Bedeutung sind die hämodynamischen Veränderungen, die sich im Verlauf des Krankheitsprozesses manifestieren. Die Makrozirkulation ist bei der Sepsis zu Krankheitsbeginn durch einen hyperdynamen Kreislaufzustand charakterisiert, wobei trotz gesteigerten Herzzeitvolumens bei einem reduzierten peripheren Gefäßwiderstand eine arterielle Hypotension resultiert. Mit zunehmender Einschränkung der kardialen Leistungsfähigkeit entwickelt sich im weiteren Verlauf schließlich ein hypodynamer Kreislaufschock (Titheradge, 1999), der durch ein reduziertes Herzzeitvolumen bei erhöhtem peripherem Widerstand gekennzeichnet ist.

Eine nicht beherrschbare arterielle Hypotension ist bei etwa 50% der an einer Sepsis versterbenden Patienten die Ursache des letalen Ausgangs.

Mikrozirkulatorische Veränderungen, bedingt durch eine Beeinträchtigung der Tonuskontrolle großer und kleiner Gefäße (Buwalda und Ince, 2002), der rheologischen Eigenschaften des Blutes (Piagnerelli et al., 2003), der Verteilung des

Blutflusses (Ince und Sinaasappel, 1999; Ellis et al., 2002) sowie der mitochondrialen Funktion mit Störung der Sauerstoffutilisation (Brealey et al., 2002; Fink, 2002) stellen neben einer erhöhten Zell-Zell-Interaktion im Besonderen von Leukozyten und Thrombozyten mit dem mikrovaskulären Endothel (Eipel et al., 2004) eine wesentliche Determinante in der Manifestation der Organdysfunktion bis hin zum Organversagen bei Sepsis dar.

Die Persistenz mikrovaskulärer Funktionsausfälle ist nachweislich mit einem schlechten „Outcome“ septischer Patienten vergesellschaftet (De Backer, 2002; Sakr et al., 2004).

2.4.1 Veränderungen der Hämorheologie

Die Hämorheologie ist die Wissenschaft der Fließeigenschaften des Blutes. Sowohl Plasmaviskosität als auch Veränderungen der Deformabilität von Erythrozyten und Leukozyten im Sinne einer erhöhten Rigidität führen zu einer Behinderung der kapillaren Passage (Piagnerelli et al., 2003; Yodice et al., 2007). Scherrate, Plasmaviskosität und Hämatokrit sowie Deformabilität und Aggregation von Erythrozyten sind Determinanten der Blut-Viskosität. Diese steigt unter Bedingungen geringer Scherraten, wie sie in postkapillaren Venolen zu finden sind, exponentiell an. Die bei Sepsis in hoher Dichte vorliegenden Makromoleküle und Akutphaseproteine beeinflussen einerseits die elektrostatische Abstoßung der Erythrozyten, andererseits fördern sie die Zellaggregation mit Ausbildung mikrovaskulärer Thromben. Somit nimmt die Blutviskosität im Sinne eines Circulus vitiosus weiter zu (Mahondas und Chasis, 1993).

Insgesamt sind die reduzierte Deformabilität sowie eine erhöhte Aggregation und Adhäsivität die Ursachen der Organsequestration der Zellen mit einer Verlegung der Mikrostrombahn und Reduktion der nutritiven Perfusion.

2.4.2 Dysfunktion der Vasomotorik

Störungen der nutritiven Perfusion sind vor allem auf die Induktion stress-induzierbarer vasoaktiver Mediatoren wie Stickstoffmonoxid, Kohlenmonoxid und Endothelin zurückzuführen. Hierbei führt eine exzessive Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothel- und Muskelzellen (Gocan et al., 2000; Wu et al., 2001) durch die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase zur arteriolären Dysfunktion und eingeschränkter mikrovaskulärer Reaktivität (Gocan et al., 2003). Die Überproduktion von NO kann als ein kausaler Faktor für die refraktäre Hypotension und die ausgeprägte Verminderung des peripheren Gefäßwiderstandes bei Sepsis angesehen werden (Booke et al., 1999; Meyer et al., 1994).

Gleichzeitig gibt es jedoch aus zahlreichen experimentellen Arbeiten Hinweise dafür, dass eine NO-Zufuhr einer Sepsis-bedingten Zunahme der Vasopressor-Aktivität entgegenwirkt (Wanecek et al., 2000; Figueras et al., 2003) und somit Störungen z. B. der hepatischen Mikrozirkulation reduziert werden können (Clemens et al., 1999; Gundersen et al., 1998). Insgesamt führt die Dysbalance vasoaktiver Mediatoren über eine inadäquate Regulation des nutritiven Blutflusses bei einem Missverhältnis zwischen Sauerstoff-Angebot und -Bedarf zu einer lokalen Gewebehypoxie.

2.4.3 Endothelzellaktivierung und -dysfunktion

Das mikrovaskuläre Endothel hat vielfältige Aufgaben zu erfüllen. Diese sind sehr spezifisch und nach Ort und Zeit differenziell reguliert. Man spricht von „vascular diversity“. Es dient der Aufrechterhaltung der Blutfluidität, der Regulation des Vasotonus, der Kontrolle der Passage von Zellen und Nährstoffen, der lokalen Balance von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren und dem Gleichgewicht von Pro- und Antikoagulation (Vines et al., 1998).

Unter den Bedingungen der Sepsis wird ein Wandel des endothelialen Phänotyps vollzogen. Ursächlich hierfür sind die direkte Infektion durch Pathogene oder die Aktivierung durch Pathogenbestandteile und proinflammatorische Mediatoren wie z. B. Komplementspaltprodukte, Cytokine, Chemokine, Proteasen

und Fibrin (Aird, 2003). Strukturelle Änderungen wie nukleäre Vakuolisierung, zytoplasmatische Schwellung und Fragmentation sowie Denudierung und Ablösung (Vallet und Wiel, 2001) gehen mit einem Verlust der Barrierefunktion, einer Zunahme der Koagulativität, Adhäsivität und Apoptose einher (Aird, 2003; Gross und Aird, 2000; Rosenberg und Aird, 1999). Aus einer Erhöhung der Endothelzellpermeabilität folgt ein extrazellulärer Flüssigkeitsverlust mit Hypovolämie, Hämokonzentration und letztlich Stase. Monozyten, Thrombozyten und Neutrophile werden durch das aktivierte Endothel angezogen und initiieren/amplifizieren ihrerseits die Koagulation (Aird, 2003). Diese wird im Rahmen der Endothelzellapoptose durch einen Verlust antikoagulativer Membrankomponenten sowie eine erhöhte Konzentration von membranständigem Phosphatidylserin verstärkt (Bombeli et al., 1997).

2.4.4 Zell-Zell-Interaktionen

Durch Endotoxin als potentes Stimulans für zelluläre Blutbestandteile erfolgt eine erhöhte Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten mit dem Endothel. Diese spielt eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung septischer Organschäden (Cohen, 2002; Schaefer et al., 2003). Aktivierte Leukozyten sind auf Grund erhöhter Expression der spezifischen Oberflächenadhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin, ICAM und VCAM (Lopez et al., 1999) befähigt, auf dem mikrovaskulären Endothel zu akkumulieren und einem chemotaktischen Gradienten folgend, das Gewebe zu infiltrieren (McIntyre et al., 2003; Ebnet et al., 1996) (Abbildung 4). Hierbei setzen sie Proteasen und andere aggressive Mediatoren frei und haben somit einen wesentlichen Anteil an der Schädigung des Gewebes (Jaeschke und Smith, 1997; Jaeschke et al., 1998; Slotta et al., 2005).

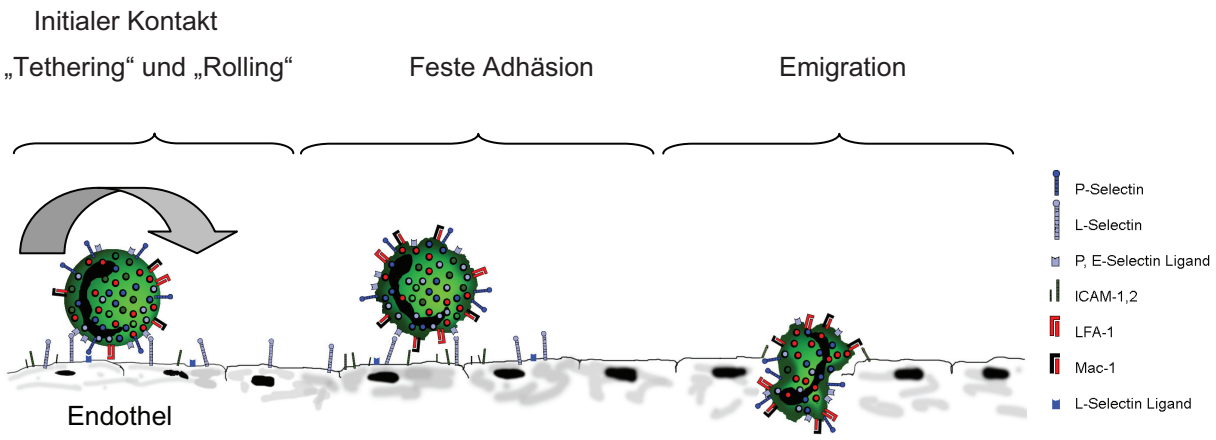


Abbildung 4: *Ablauf der Rezeptor-gesteuerten Leukozytenadhäsion am Endothel und der Leukozytenmigration unter Entzündungsbedingungen.*

Neben der Fähigkeit, Sauerstoffradikale (Leo et al., 1997) und eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren wie Thromboxane, Leukotriene, Serotonin, Plättchenfaktor 4 und PDGF freizusetzen (Weyrich et al., 1996), können aktivierte Thrombozyten die Funktion von Leukozyten modulieren (Faint, 1992; Vincent et al., 2002). Über einen P-Selektin-abhängigen Mechanismus induzieren aktivierte Thrombozyten die Superoxidanion-Produktion durch Monozyten und Neutrophile (Nagata et al., 1993) sowie die intravaskuläre Leukozyten-Akkumulation mit nachfolgender Fibrin-Deposition (Palabrica et al., 1992). Durch P-Selektin-abhängige Adhäsion von Thrombozyten an Neutrophile werden deren möglicher Zelltod inhibiert (Andonegui et al., 1997) und somit durch eine Erhöhung der Lebenszeit von Leukozyten deren gewebsschädigende Funktionen verlängert (Andonegui et al., 1997). Der aus dem Synergismus von aktivierten Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen entstehende Circulus vitiosus ist durch nekrotischen und apoptotischen Zelluntergang charakterisiert (Schaefer et al., 2003), wobei apoptotische Parenchymzellen ihrerseits durch Chemotaxis die inflammatorische Zell-Zell-Interaktion aufrechterhalten (Eipel et al., 2004).

2.5 Die durch gram-negative Bakterien ausgelöste Sepsis und die Rolle der Monozyten und Makrophagen

LPS löst schon in kleinsten Mengen die Synthese und Ausschüttung hoher Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in Abwehrzellen aus. Bedeutend für diese Reaktion sind die Gewebsmakrophagen mit einem großen Einfluss auf den systemischen Zytokinspiegel (Nathan, 1987; Schumann et al., 1994).

Die von Makrophagen und deren Vorläufern, den Monozyten, bei Stimulation mit LPS synthetisierten und sezernierten Stoffe sind vielfältig. Es werden Sauerstoffradikale bis hin zu Makromolekülen gebildet (Nathan, 1987). Für den Inflammationsprozess von besonderer Bedeutung sind die Zytokine IL-1b, IL-6 und TNF-α, welche eine Vielzahl anderer Zellen wie z. B. Endothelzellen, Lymphozyten und Hepatozyten aktivieren. Endothelzellen ermöglichen auf Grund dieses Stimulus die Adhäsion und Diapedese von Granulozyten und initialisieren somit die inflammatorische Reaktion (Casale und Carolan, 1990). Die Leukozytenaktivierung führt zur verstärkten Abwehr, und die Hepatozyten synthetisieren spezielle, für die Abwehr bedeutsame, sogenannte Akute-Phase-Proteine (Green et al., 1998; Baumann und Gauldie, 1994). Die beginnende Reaktionskaskade dient einerseits der Erregerabwehr, kann aber auch andererseits überschießen und so zu Sepsis und septischem Schock führen (Parrillo, 1993; Michie et al., 1988; Strassburg, 2003).

2.6 Rolle der Leber bei bakterieller Sepsis

Die Leber hat eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der Sepsis. Sie wird von mehr als 25% des Herzminutenvolumens durchströmt. Es stammt hauptsächlich aus dem viszero-mesenterialen Gefäßbett, welches bei Sepsis besonders von Vasokonstriktion und bakterieller Translokation betroffen ist. Primär TNF-α-vermittelte Interaktionen zwischen Hepatozyten, Kupfferzellen und sinusoidalen Endothelzellen führen zu einer inflammatorischen Antwort und sind zentrale Ursache der „Schockleber“ (Strassburg, 2003; Dhainaut et al., 2001). Die Leber wird einerseits durch das Schockgeschehen geschädigt, kann andererseits aber zum Systemischen Inflammationssyndrom beitragen (Strassburg, 2003). Die Hepatozyten erfahren eine signifikante Veränderung ihrer Syntheseleistung, des Galletransports, des Galleflusses und des Glucosemetabolismus. Kupfferzellen bewirken ein chemotaktisches Einwandern neutrophiler Granulozyten in die Leber und aktivieren diese. Neutrophile erhöhen die Anzahl ihre Oberflächenadhäsionsmoleküle und binden an sinusoidale Zellen. Die Erhöhung der Integrinzahl auf Endothelzellen fördert die Neutrophilen-Migration und mikrovaskuläre Thrombenbildung. Nach Migration in das Parenchym bilden die Neutrophilen Sauerstoffradikale und Proteasen, die zu einer weiteren Schädigung der Hepatozyten führen. Diese Kaskade führt zur mikrozirkulatorischen Störung, Fibrin-Ablagerung, Fortschreiten des inflammatorischen Prozesses und zum Multiorganversagen (Dhainaut et al., 2001). Zu einer zusätzlichen Schädigung von Endothelzellen und Parenchymzellen kommt es durch Mediatoren, die im Rahmen der Reperfusion gebildet und freigesetzt werden (Doi et al., 1993).

2.7 Hepatozelluläre Apoptose und Nekrose

Als Apoptose bezeichnet man den genetisch programmierten Zelltod. Er wird induziert durch die Aktivierung von Proteasen, welche die Zellkerndegeneration und -kondensation sowie Kern-DNA-Degradation und Phagozytose von Zellbestandteilen bewirken (Abbildung 5). Diese Vorgänge führen zum Abbau der Zelle (Haslett und Savill, 2001) und wurden zum ersten Mal 1972 durch Kerr et al. als eigenständiger, aktiver Prozess beschrieben.

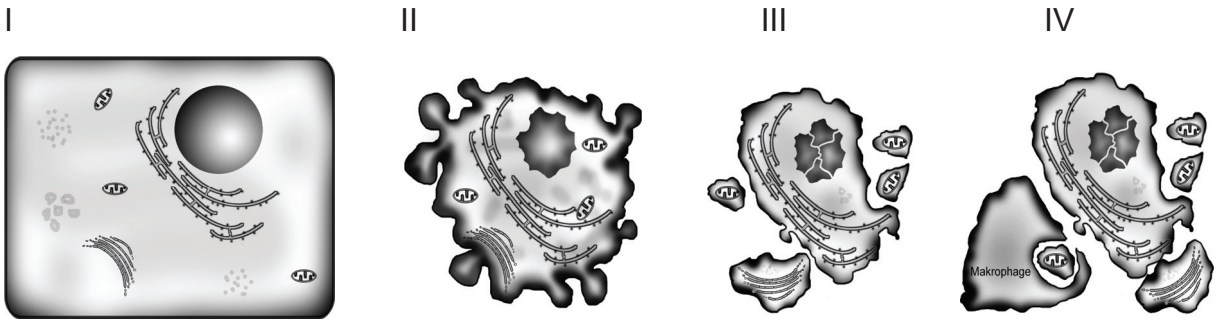


Abbildung 5: *Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose. Ausgehend von einer normalen Zelle (I) zeigt die Abbildung die verschiedenen Stadien, die eine apoptotische Zelle durchläuft. Zunächst zieht sich die Zellmembran unter Verlust von Wasser zusammen und bildet dabei Ausstülpungen aus, was als "membrane blebbing" bezeichnet wird. (II) Kleine, membranumschlossene Abschnürungen treten auf, die so genannten apoptotischen Körperchen. (III) Gleichzeitig zerfällt der Kern, wobei allerdings die Bruchstücke weiterhin von einer intakten Kernmembran umgeben bleiben. Schlussendlich werden die Zerfallsprodukte der apoptotischen Zellen von Makrophagen phagozytiert (IV).*

Es gibt Belege dafür, dass der apoptotische Zelltod, besonders der Lymphozyten und gastrointestinalen Epithelzellen ein Bestandteil der Pathogenese und der Entwicklung des septischen Geschehens ist (Hotchkiss et al., 1999; Hotchkiss et al., 2001; Oberholzer et al., 2001). Die endogene Freisetzung von Glucocorticosteroiden scheint an dem apoptotischen Zelltod von Lymphozyten beteiligt zu sein (Fukuzuka et al., 2000). Eine erhöhte Apoptoserate trägt über einen Verlust an B-, T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen zu einer Immunsuppression bei. Diese

erhöht signifikant das Risiko einer sekundären opportunistischen Infektion und das Risiko der Entwicklung von Komplikationen bei Sepsis, wie z.B. MODS und Multiorganversagen (Oberholzer et al., 2001; Voll et al., 1997).

Im Gegensatz zur Apoptose stellt die Nekrose den pathologischen Untergang einzelner oder mehrerer Zellen nach irreversiblem Ausfall der Zellfunktionen dar (Tabelle 2).

Apoptose	Nekrose
• organisierter Suizid der Zelle • genetische Regulation • Schrumpfen der Zelle	• unorganisierter Zelltod • metabolische Regulation • Schwellen der Zelle • Ruptur der Zytoplasmamembran
• Zytoplasmamembran bildet Ausstülpungen aus (“membrane blebbing“)	
• Bildung und Freisetzung von „apoptotischen Partikeln“ • Aktivierung von spezifischen Proteinen der Apoptose-Maschinerie • Fragmentierung des Nukleus	• Platzen der Zelle • Freisetzung des Zytoplasmas • Aktivierung unspezifischer, lysosomaler Proteine • Zerstörung der Zellkomponenten ohne Fragmentierung des Nukleus
• Kondensation des Chromatins • Fragmentierung der DNA • keine Inflammation	• Abwesenheit von DNA-Fragmentierung • lokale Inflammationsreaktion

Tabelle 2: *Charakteristika von Apoptose und Nekrose*

Apoptose und Nekrose stellen 2 Extreme des Zellunterganges dar (Formigli et al., 2000). Es konnten Zwischenstufen und Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose nachgewiesen werden. Diese wurden unter dem Begriff der „necrapoptosis“ (Aponekrose) zusammengefasst (Lemasters, 1999).

Die Inhibition der Caspase 3, ein bedeutendes Enzym der DNA-Degradation bei Apoptose, bewirkt in Abhängigkeit der zellulären ATP-Konzentration eine Verschiebung der ablaufenden Apoptose / Aponekrose hin zur Nekrose (Formigli et al., 2000). Die unter physiologischen Bedingungen ablaufende Apoptose führt unter pathophysiologischen Bedingungen häufig durch sekundär induzierte Nekrose mit Stimulation der Zytokin- und Chemokinproduktion zur Entzündungsreaktion (Jaeschke und Lemasters, 2003).

Ein Übergang von Apoptose zur Nekrose mit Zwischenformen ist aufgrund gemeinsamer Stoffwechselwege möglich (Formigli et al., 2000; Jaeschke und Lemasters, 2003; Lemasters, 1999; Papucci et al., 2004).

2.8 Die Kupfferzelle

Kupfferzellen, die ortsständigen Makrophagen der Leber, sind nach dem Pathologen C. von Kupffer, dem Erstbeschreiber dieser nichtparenchymalen Zellen, benannt (Wake, 1980). Innerhalb des Lumens der Lebersinusoide liegend sind sie die erste Makrophagenpopulation des Organismus, die mit Bakterien, bakteriellen Endotoxinen und mikrobiellen Bestandteilen aus dem Gastrointestinaltrakt, via Portalvene in Kontakt treten (Fox et al., 1987). Neben Natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und löslichen Blutbestandteilen wie Komplementfaktoren und Akute Phase Proteinen repräsentieren Kupfferzellen einen bedeutsamen Teil des angeborenen Immunsystems (Parker und Picut, 2005). Die Tatsache, dass sie in der Leber lokalisiert sind und 80-90% der Gewebsmakrophagen des Körpers bilden, lässt eine zentrale Rolle der Leber bei lokaler und systemischer Abwehr erwarten.

Kupfferzellen scheinen sich von den zirkulierenden Monozyten abzuleiten. Diese entstammen dem mononukleär-phagozytierenden System im Knochenmark gebildeter Monozyten, die über das Blut in verschiedene Gewebe migrieren und dort zu Gewebsmakrophagen transformieren (van Furth, 1992). Weiterhin unterliegen Kupfferzellen einer limitierten Selbsterneuerung (Naito et al., 1997) und haben eine Lebenserwartung bis zu einem Jahr beim Menschen (Steinhoff et al., 1989).

Kupfferzellen sind allerorts in der Leber angesiedelt. Die Populationsdichte, zytologischen Charakteristika und physiologischen Funktionen unterliegen zonalen Unterschieden der Leberazini. Große Kupfferzellen sind überwiegend in der periportalen Region des Leberazinus lokalisiert, dem Ort des Erstkontakts mit pathogenen Blutbestandteilen. Entsprechend haben periportale Kupfferzellen eine höhere lysosomale Enzymaktivität und Phagozytosekapazität gegenüber den kleinen Kupfferzellen in der midzonalen und perizentralen Region (Sleyster und Knook, 1982).

Im Gegensatz zu einer hohen Syntheseleistung an TNF-α, PGE_2 und IL-1 der großen Kupfferzellen bilden kleine Kupfferzellen eine große Menge NO (Hoedemarkers et al., 1995).

Reife Gewebsmakrophagen exprimieren eine Vielzahl an Rezeptoren, wie M130, p155 und CD 163 (Fabriek et al., 1995). Sie gehören zur Familie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren. Bei Ratten wird CD68 als ED1 Antigen beschrieben und dient als Ziel der Detektion ED1-positiver Kupfferzellen mit dem monoklonalen anti-ED1 Antikörper. Das Ausmaß der CD68 Expression unterliegt zahlreichen Faktoren. So können Glucocorticoide und andere antiinflammatorische Mediatoren die Expression steigern und proinflammatorische Mediatoren wie LPS, IFN-γ und TNF-α erniedrigen (Buechler et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen in geringem Umfang CD68 exprimieren (Dijkstra et al., 1985).

2.9 Experimentelle Infektions- und Sepsismodelle

Infektions- und Sepsismodelle werden nach Deitch (Deitch, 1998) in Infektionsmodelle, Modelle mit intravaskulärer Bakterieninfusion und Endotoxinmodelle eingeteilt.

Bei der Anwendung von Infektions- und Sepsismodellen sind drei Punkte zu berücksichtigen:

1. aufgrund der Heterogenität der Erkrankungen des Menschen kann kein einzelnes Modell der intraabdominalen Infektion den endgültigen Beweis der Wirksamkeit eines therapeutischen Agens liefern.
2. aufgrund des einzigartigen Modellaufbaus hat jedes Modell spezifische Vor- und Nachteile, die je nach Aufbau und Art des Modells von unterschiedlicher Bedeutung sind.
3. um bei jungen gesunden Nagetieren einen reproduzierbaren Infektionsstatus zu etablieren, ist die Inokulation einer großen Bakterienanzahl erforderlich. Diese Anzahl ist erforderlich, um die körpereigene Abwehr des Tieres zu überwinden,

gleichzeitig bewirkt sie aber einen außerordentlich raschen und fulminanten klinischen Verlauf, der den Infektionsverlauf beim Menschen nicht wiederspiegelt.

Man unterscheidet 4 Gruppen von intraabdominalen Sepsismodellen (siehe Tabelle 3).

- intraperitoneale Injektion eines Bakterienbestandteils (z.B. LPS)
- intraperitoneale Platzierung von Faeces mit/ohne Aduvant (das Adjuvant verzögert die Keimeliminierung durch das Peritoneum)
- intraperitoneale Platzierung einer definierten Menge eines einzelnen Bakterienstammes oder einer gemischten Bakterienflora mit/ohne Adjuvant
- Bildung einer endogenen fäkalen Kontaminationsquelle durch Eröffnung des Intestinums (Bsp. Coecal ligation and puncture (CLP) oder Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP))

Tabelle 3: *Arten der intraabdominalen Sepsismodelle*

Die Endotoxinmodelle beinhalten die Applikation einer subletalen LPS-Dosis, als kontinuierliche LPS-Infusion oder einer einmaligen LPS-Injektion.
Das LPS-Modell basiert auf der Annahme, dass die Immunantwort des Wirtes und nicht das pathogene Agens selbst zum Organversagen und zum Tode führt. So sind der septische Schock und das Multiorganversagen (MODS) Folge der Induktion und/oder Aktivierung der zellulären und humoralen immunlogischen Entzündungsantwort, welche durch Bakterienbestandteile wie Endotoxin getriggert wird. Basierend auf dieser Annahme wird Endotoxin als grundlegender Bakterienbestandteil angesehen, der den Vorteil der einfachen Anwendung hat und reproduzierbare Effekte liefert (Deitch, 1998).

Das Faeces Modell wurde in den 1960-iger und 70-iger Jahren zur Erforschung der Faktoren, welche zur Ausbildung einer Peritonitis gegenüber eines lokalen Abszesses beitragen, entwickelt. In diesem Modell wird Faeces zusammen mit einem Adjuvant als Pellet in einer Gelatinekapsel oder in einem Fibrinklumpen in den Bauchraum eingebracht (Weinstein et al., 1974; Bartlett et al., 1978; Nichols et al., 1978). Das Adjuvant dient der Verzögerung der Elimination der fäkalen Bakterien und verlängert den Krankheitsverlauf.

Weiterentwicklungen des Faeces-Modells stellen Modelle dar, in denen eine definierte Bakterienkultur in definierter Menge in das Peritoneum eingebracht wird (Hansson et al., 1985; Bosscha et al., 2000; Mathiak et al., 2000).

Die CLP ist der Prototyp des endogenen fäkalen Kontaminationsmodells. Hierbei wird das Caecum ligiert und mittels einer Nadel punktiert (Wichtermann et al., 1980). Der Krankheitsverlauf kann durch die Nadelgröße bzw. die Anzahl der Punktionen gesteuert werden. Eine Alternative stellt das CASP Modell dar, welches erstmalig 1998 (Zantl et al., 1998) beschrieben wurde. In diesem Modell wird ein Stent in die Wand des Colon ascendens implantiert und ermöglicht somit den Übertritt von Faeces aus dem Darmlumen in die Bauchhöle. Der Stent verhindert einerseits den Verschluss der Lumenöffnung, andererseits lässt sich mittels der Stentgröße der Krankheitsverlauf steuern. Je größer der Stent, desto größer ist die Mortalität (Zantl et al., 1998).

Jedes der genannten Modelle hat spezifische Vor- und Nachteile, die bei der Auswahl des angewandten Modells zu berücksichtigen sind.

3 Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, mit Hilfe des etablierten Modells der intravitalen Epifluoreszenzmikroskopie der Rattenleber die durch Endotoxininjektion hervorgerufenen mikrozirkulatorischen Störungen und Zell-Interaktionen der Leber zu untersuchen. Von besonderem Interesse war die Aktivierung von Leukozyten, Endothelien, apoptotischen Hepatozyten und Kupfferzellen sowie deren Zell-Zell-Interaktion nach Endotoxinämie.

Auf folgende Fragen wurde näher eingegangen:

1) Bewirkt die induzierte Endotoxinämie eine inflammatorische Antwort mit Mikrozirkulationsstörung, vermehrter intrahepatischer Leukozyten-akkumulation und hepatischem Parenchymzellschaden?

2) Kommt es in Folge der inflammatorischen Antwort zu einer vermehrten Zell-Zell-Interaktion von Leukozyten, Endothelien, apoptotischen Hepatozyten und Kupfferzellen nach Endotoxinämie?

3) Welchen Einfluss hat die Aktivierung von Makrophagen auf die Vermittlung der hepatozellulären Apoptose?

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

In die Studie wurden 25 männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River Wiga; Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht zwischen 250-350g aufgenommen. Sie wurden vor Beginn der experimentellen Untersuchungen für mindestens 4-5 Tage in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. H. Stein), artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in Gruppen von zwei bis drei Tieren in einem Laborkäfig bei 12 stündigem Tag-/Nachtzyklus unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter ad libitum gehalten.

4.2 Experimentelles Modell

Die experimentelle Endotoxinämie wurde durch eine einmalige Applikation von LPS (Serotyp 0128:B12; Sigma, Taufkirchen, Germany) intraperitoneal oder über die Schwanzvene induziert. Das tierexperimentelle Modell wurde bereits in den 60-iger Jahren von Lillehei beschrieben (Lillehei et al., 1963). LPS wurde unmittelbar vor Applikation in physiologischer NaCl-Lösung gelöst. Unter kurzzeitiger Ethernarkose wurde das LPS in einer Dosierung von 10 mg/kg KG injiziert. Tiere der Kontrollgruppe erhielten äquivalente Volumina physiologischer NaCl-Lösung.
Neben der Kontrollgruppe (n = 9) ergab sich somit eine Gruppe (n = 10), die 6 Stunden nach i.p. LPS-Applikation und eine weitere (n = 6), die 16 Stunden nach i.v. LPS-Applikation untersucht wurde.

4.3 Anästhesie und chirurgische Technik

Die Anästhesie der Tiere wurde mit Pentobarbital (50 mg/kg KG) eingeleitet. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Anschließend wurde den Tieren Hals und Abdomen rasiert und sie wurden in Rückenlage auf einer Wärmplatte positioniert. Mit Hilfe einer rektal platzierten Sonde wurde die Körpertemperatur während des Eingriffs überwacht und durch Rückkopplung zur Heizplatte konstant bei 36 - 37°C gehalten.

Der chirurgische Eingriff am Hals wurde mit einem medialen Hautschnitt begonnen. Nach stumpfer Dissektion des subkutanen Fettgewebes wurde die Trachea freigelegt und zur nachfolgenden Positionierung eines Katheters tracheotomiert. Dies erleichterte die Spontanatmung der Tiere. Es schloss sich die Darstellung der Halsgefäße zur Insertion der Katheter an. Zuerst wurde die Vena jugularis externa infolge einer queren Inzision der Gefäßwand kanüliert (Abbildung 6). Der so platzierte Katheter ermöglichte die Applikation des Anästhetikums Pentobarbital, um die Narkose während des gesamten Eingriffs aufrecht zu halten sowie die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe. Zur Messung der Vitalparameter und zur Applikation von fluoreszierenden Latexpartikeln wurde die Arteria carotis communis kanüliert. Es wurden die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Druck (MAP) ermittelt. Der mittlere arterielle Druck wurde über einen druckstabilen PE50 Katheter auf einen Druckwandler übertragen und auf einem Überwachungsmonitor kontinuierlich angezeigt. Die Herzfrequenz der Versuchstiere wurde anhand der arteriellen Blutdruckamplituden fortlaufend aufgezeichnet und durch Auszählen der Amplitude an einem Standbild quantifiziert. Es wurde Blut für nachfolgende Untersuchungen entnommen. Diese umfassten die Blutgasanalyse und die Bestimmung des Differentialblutbildes.

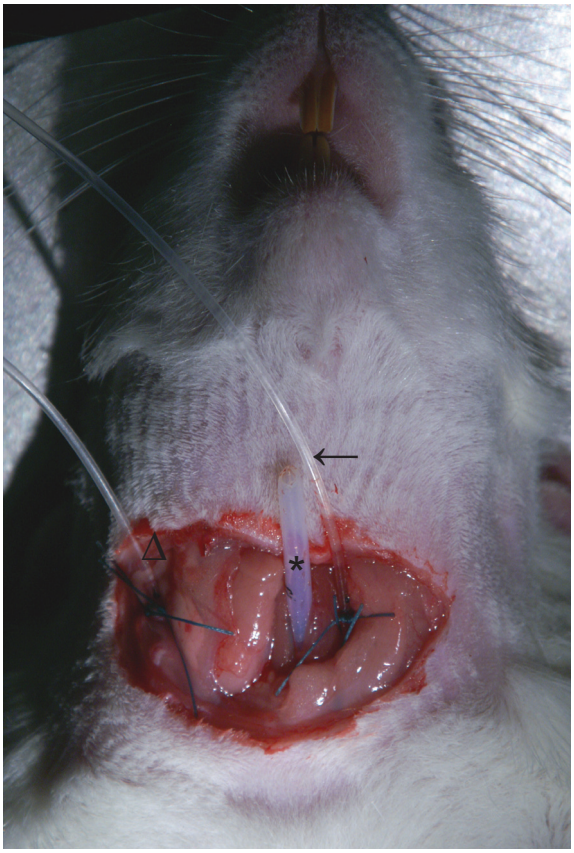


Abbildung 6: *Darstellung der Halsregion nach Tracheotomie (*) mit Katheterisierung zur Erleichterung der Spontanatmung und Insertion von Kathetern in die Vena jugularis externa (Δ) (Applikation des Anästhetikums und der Farbstoffe) und Arteria carotis communis (←) (Überwachung der Vitalparameter sowie Applikation der Latexpartikel).*

Anschließend wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, um die Leber auszulagern. Der kraniale Wundrand wurde mit Hilfe von auf der Wärmplatte magnetisch haftenden Wundhaken fixiert. Nach Durchtrennung des Ligamentum gastrosplenicum wurden der Magen und der Darm mit Hilfe feuchter Wattetupfer nach kaudal mobilisiert und dort unter einem feuchten Bauchtuch fixiert. Die Durchtrennung der Haltebänder der Leber ermöglichte, unter Zuhilfenahme zweier Wattestäbchen, eine Mobilisierung des linken Leberlappens auf einen beweglichen löffelförmigen Untersuchungstisch aus Knetmasse (Abbildung 7). So wurden eine sichere Positionierung des Leberlappens und die Schaffung einer planen Untersuchungsfläche erzielt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Leberlappen und im Besonderen die Untersuchungsfläche möglichst nicht berührt wird, um Gewebealterationen durch chirurgische Manipulationen und Traumatisierungen zu minimieren.

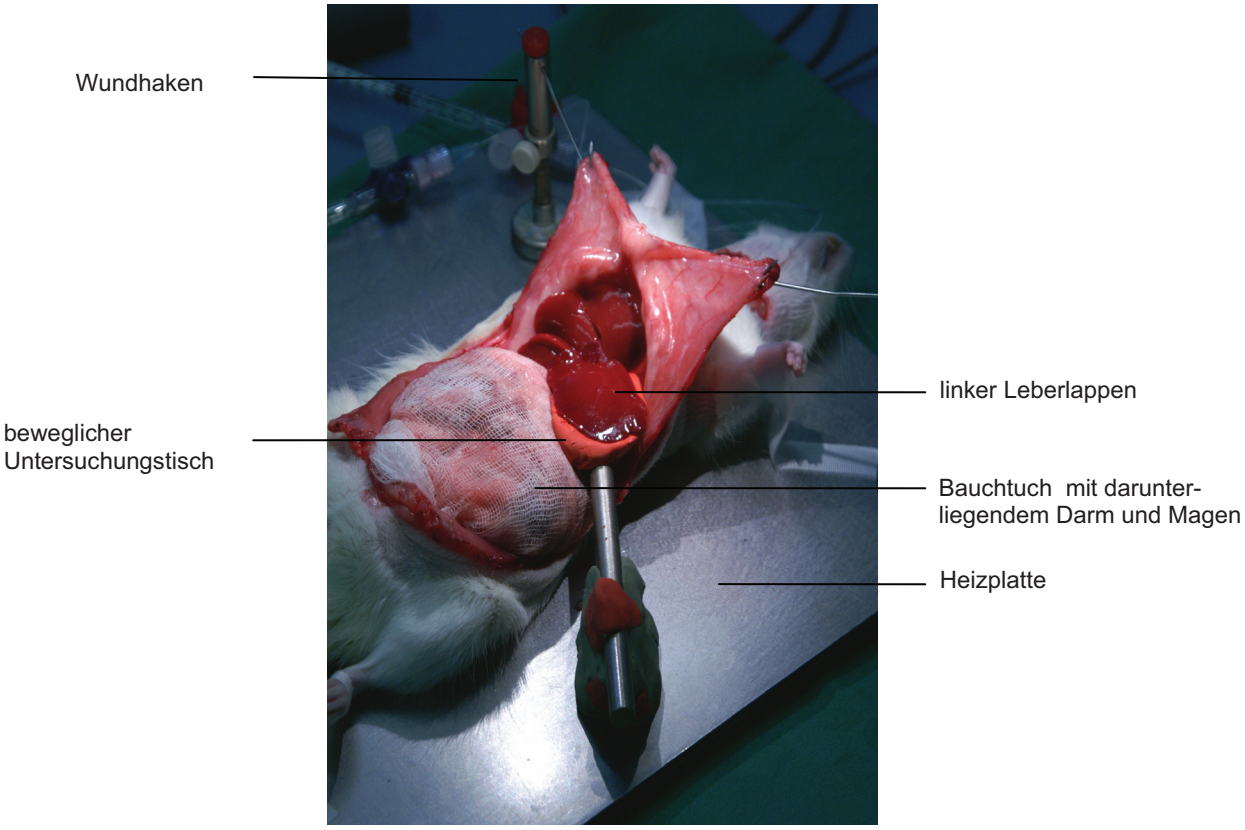


Abbildung 7: *Situs der Baucheingeweide der männlichen Ratte. Der Magen und Darm wurden nach kaudal mobilisiert und mittels eines feuchten Bauchtuchs abgedeckt. Es ist die plane Unterseite des linken Leberlappens nach Mobilisation auf den beweglichen Untersuchungstisch einzusehen.*

Die Auslagerung des Leberlappens erfolgte daher ausschließlich unter Verwendung feuchter Wattestäbe. Um Austrocknen und Interferenzen des Gewebes mit der Umgebungsluft zu verhindern, wurde auf die Leberoberfläche ein Deckgläschen gelegt. Anschließend wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie des Leberlappens vorgenommen.

4.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem modifizierten Epifluoreszenzmikroskop von Nikon durchgeführt (Eclipse E600-FN, Nikon, Tokio, Japan). Für die Analyse der Mikrozirkulation wurde der linke Leberlappen auf einen mobilen Beobachtungstisch ausgelagert. Nach Lagerung des Tieres unter dem Mikroskop wurde der Beobachtungstisch ausgerichtet, um eine horizontale Lage und eine Fokussierung des gesamten Beobachtungsareals zu realisieren. Für die Auflichttechnik wurde eine Quecksilber (100W) Lichtquelle benutzt. Die verwendeten Filterblöcke erlaubten eine Anregung mit Licht der Wellenlänge 330-380 nm, 450-490 nm bzw. 530-560 nm und eine Filterung des emittierten Lichts unterhalb 415 nm, 520 nm bzw. 580 nm. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer charge-coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde auf den Monitor übertragen und auf Videoband (Panasonic, AG-7350-E, Matsushita, Tokio, Japan) gespeichert, um anschließend an einem computer-gestützten Bildverarbeitungsprogramm (CapImage, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) analysiert werden zu können. Datum und Uhrzeit wurden über einen in das Videosignal eingefügten Videozeitgenerator (VTG 33, FOR-A-Company, Tokio, Japan) aufgezeichnet.

Die quantitative Darstellung der hepatischen Mikrozirkulation erfolgte unter Nutzung eines 20x Wasser-Immersionsobjektives (Achroplan, Zeiss, 0,5 NA). Der Einsatz des 40x Wasser-Immersionsobjektives (Achroplan, Zeiss, 0,8 NA) diente der Darstellung apoptotischer Hepatozyten, adhärenter Leukozyten und von Makrophagen sowie deren Interaktionen in den untersuchten Leberläppchen. Mithilfe dieser Objektive konnten auf dem 19“ Monitor (Ikegami Electronics, Neuss, Deutschland) Vergrößerungen von x332 bis zu x583 erzielt werden (Abbildung 8).

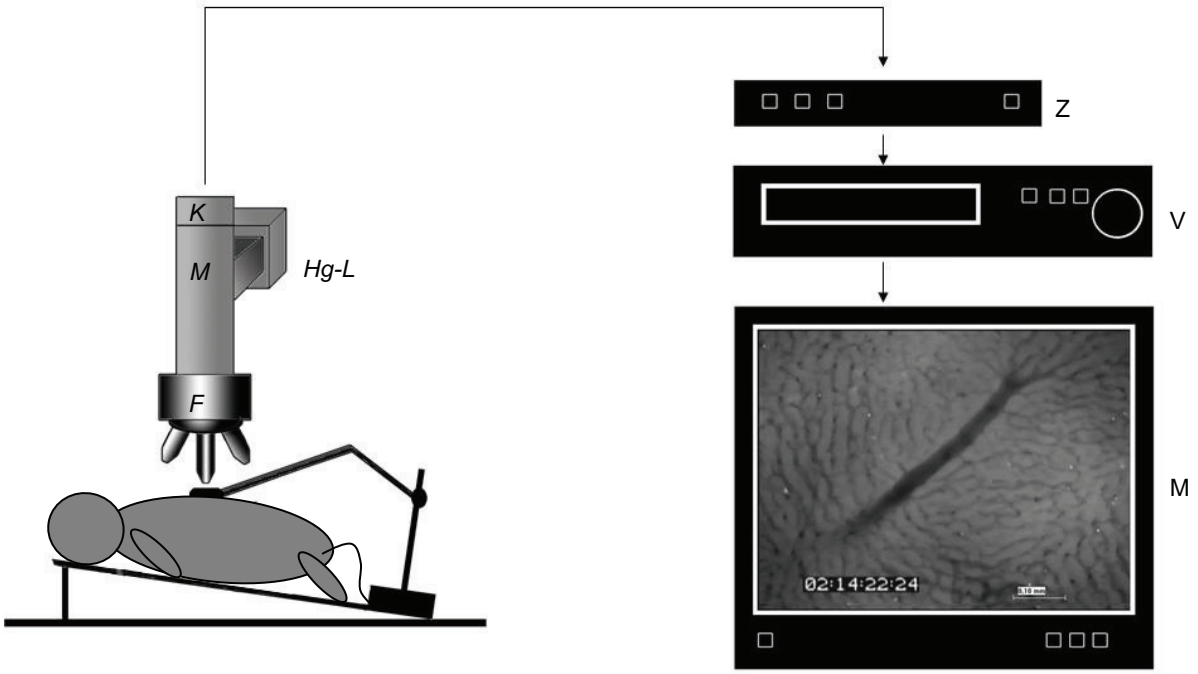


Abbildung 8: *Schematische Darstellung des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes, bestehend aus Mikroskop (M), den Filterblöcken (F), der 100W-Lampe (Hg-L) und der CCD-Kamera (K), von der die Bilder über einen Zeitgenerator (Z) an einen Monitor (M) weitergeleitet werden, der an einen Videorekorder (V) angeschlossen ist. Der Leberlappen ist für die in vivo Analysen auf einen mobilen Beobachtungstisch ausgelagert. Auf dem Monitor ist eine postsinusoidale Venole nach Kontrastverstärkung durch intravenöse Applikation von Natrium-Fluoreszein dargestellt.*

Die Anhebung des Tieres im Kopfbereich ermöglicht die plane Fläche des Leberlappens nahezu frei von Atembewegungen parallel zur Fokusebene des Mikroskops zu positionieren.

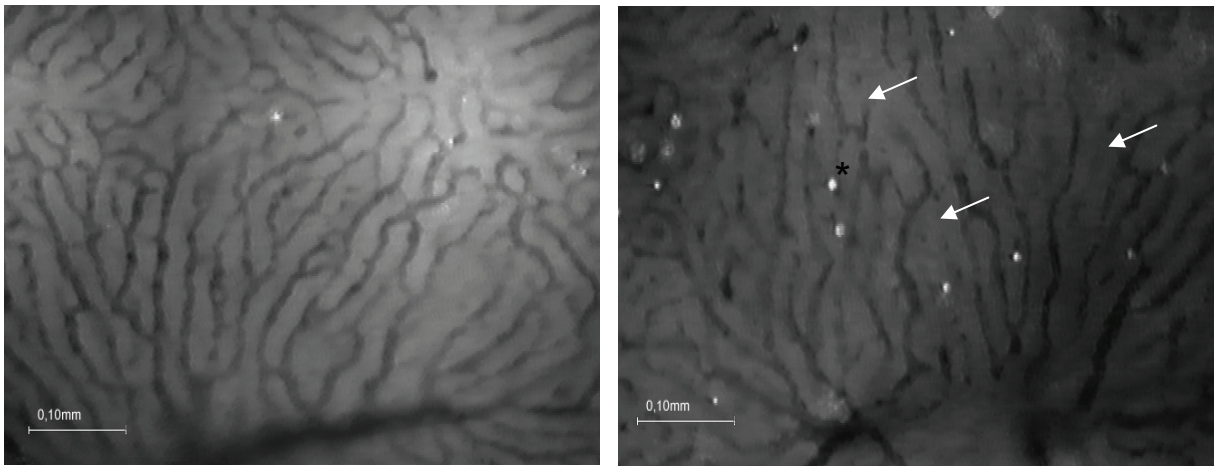
Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubte die quantitative Analyse folgender mikrohämodynamischer Parameter:

Unter Verwendung des 20x Wasser-Immersionsobjektives wurde (1.) das sinusoidale Perfusionsversagen als Maß für die nutritive Perfusion der Leber analysiert. Des weiteren wurde (2.) die parenchymale NADH-Autofluoreszenz als Indikator des

mitochondrialen Redoxstatus und somit der hepatischen Gewebeoxygenierung bestimmt. Ebenso wurde das Fließverhalten der Leukozyten in der mikrovaskulären Strombahn der Leber anhand der Erfassung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (3.) in den Sinusoiden und (4.) in den postsinusoidalenen Venolen analysiert. Weiterhin wurde (5.) und (6.) die Phagozytose von Latexpartikeln in den Sinusoiden bzw. den Venolen erfasst.
Mit Hilfe des 40x Wasser-Immersionsobjektives wurde (7.) die Kolokalisation von apoptotischen Hepatozyten und Makrophagen sowie (8.) die Kolokalisation von Makrophagen und Leukozyten analysiert.

4.4.1 Sinusoidales Perfusionsversagen

Die quantitative Analyse des sinusoidalen Perfusionsversagens erfolgte anhand der Erfassung der Zahl nicht perfundierter Sinusoide. Dieser Parameter erfasst die Anzahl aller nicht perfundierten Sinusoide in Prozent in Bezug auf alle sichtbaren Sinusoide, die eine 200 µm lange in das Beobachtungsfeld gelegte Linie midzonal kreuzten (Abbildung 9a, 9b).



a *b*

Abbildung 9: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (a) regulär perfundierter Lebersinusoide und (b) irregulär perfundierter Lebersinusoide, die durch eine unterbrochene Gefäßzeichnung (Beispiel →) gekennzeichnet sind sowie Darstellung von Latexpartikeln (Beispiel *). Kontrastverstärkung mittels Natrium-Fluoreszein. (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ——— 100µm).*

Die Visualisierung der Sinusoide wurde nach intravenöser Applikation von 0,1% Na-Fluoreszein (2 µmol/kg KG, MW 376 Da, Blaufilter: Anregung/Emission 450-490 nm/>520 nm) (Abbildung 10) ermöglicht (Vollmar et al., 1994). Na-Fluoreszein diffundiert als kleines Molekül rasch aus den sinusoidalen Gefäßen über den Disse'schen Raum und wird von den Hepatozyten aufgenommen. Dadurch kommt es zur Anfärbung des Parenchyms und durch sogenannte Negativkontrastierung der Gefäße zur Darstellung des mikrovaskulären Gefäßbettes der Leber.

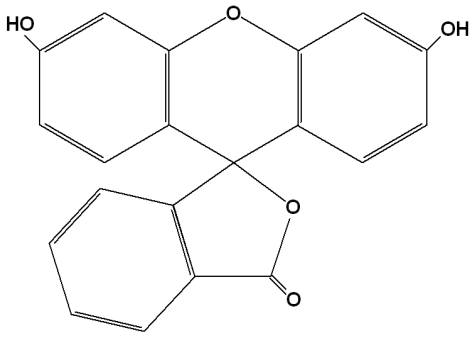


Abbildung 10: *Darstellung der Struktur von Na-Fluoreszein*

Pro Versuch wurden in randomisierter Abfolge 10 Gesichtsfelder des linken Leberlappens bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Jedes dieser Felder wurde über 10 Sekunden beobachtet und aufgezeichnet, um ein repräsentatives Bild der Perfusion darzustellen.

4.4.2 Parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz

Die Erfassung der NADH-Autofluoreszenz (Abbildung 11, 12) (UV-Filter: Anregung/Emission 330-380 nm/>415 nm), die als Indikator für den mitochondrialen Redoxstatus und die hepatische Gewebeoxygenierung dient, erfolgte durch Anregung der parenchymatösen Autofluoreszenz mit Hilfe der Lichtquelle. Die Visualisierung von NADH erfolgte nach vollständigem Erlöschen der Vitamin A Autofluoreszenz von Ito-Zellen durch UV-Licht. NADH akkumuliert im Rahmen der

oxidativen Phosphorylierung bei mangelnder Sauerstoff-Versorgung der Zelle. Die emittierte Lichtmenge entspricht dem Gewebegehalt an NADH, welcher negativ mit der Gewebeoxygenierung korreliert.

Pro Versuch wurden in randomisierter Abfolge 10 Gesichtsfelder bei 20-facher Vergrößerung über 10 Sekunden lang beobachtet und aufgezeichnet. Pro Gesichtsfeld wurden 5 randomisierte Parenchymareale densitometrisch vermessen und als Graustufenwert erfasst (Vollmar et al., 1997).

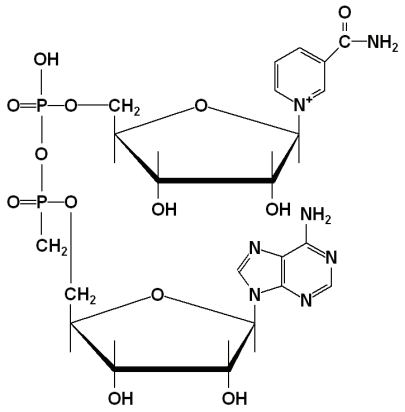


Abbildung 11: *Darstellung der Struktur von NAD^+*

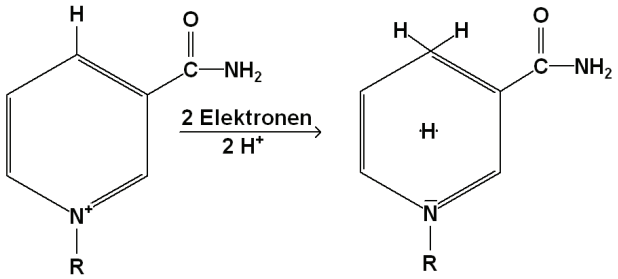


Abbildung 12: *Darstellung der Überführung von NAD^+ in $NADH_2$ durch Aufnahme von 2 Protonen*

4.4.3 Sinusoidale Leukozytenkinetik

Die Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion als Indikator der inflammatorischen Antwort erfolgte nach intravenöser Injektion von 0,5% Rhodamin-6G (1 µmol/kg KG, Grünfilter: Anregung/Emission 530-560 nm/>580 nm). Dieser Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht die selektive Anfärbung von Leukozyten, indem er in die Mitochondrien und Zellkerne interkaliert (Baatz et al., 1995; Horobin und Rashid, 1990) (Abbildung 13).

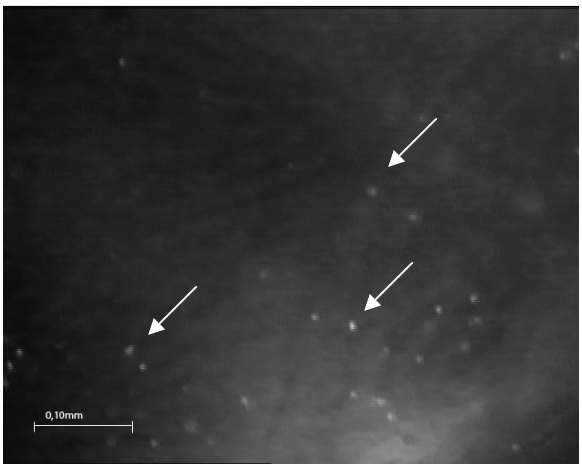


Abbildung 13: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Visualisierung von Leukozyten nach Anfärbung mit Rhodamin-6G (Beispiel →). Visualisierung im Grünfilter. (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ------- 100µm).*

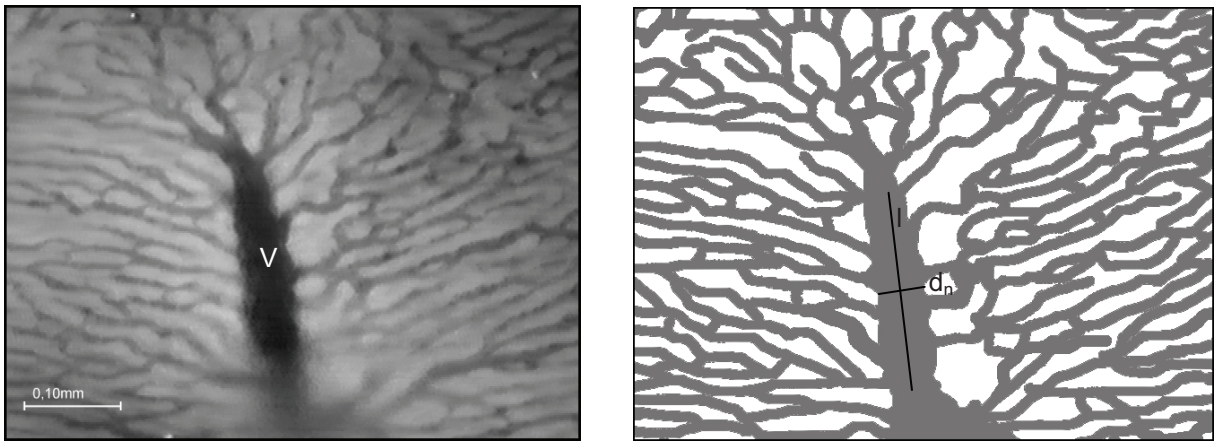
Die Beobachtung der Interaktion der Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel erfolgte in den Sinusoiden der Leberläppchen. Stagnierende Leukozyten (´Sticker´) wurden erfasst, frei und verlangsamt fließende Leukozyten blieben unberücksichtigt. Jedes Gesichtsfeld wurde über einen Zeitraum von mindestens 20 Sekunden aufgenommen.

Als adhärent wurden Zellen definiert, die über einen Zeitraum von 20 Sekunden stationär an der Endotheloberfläche hafteten. Die Anzahl fest am Endothel adhärenter Leukozyten wurde pro untersuchtem Gesichtsfeld durch manuelles Auszählen ermittelt und als Anzahl pro Leberoberfläche (n/mm²) angegeben.

4.4.4 Venuläre Leukozytenkinetik

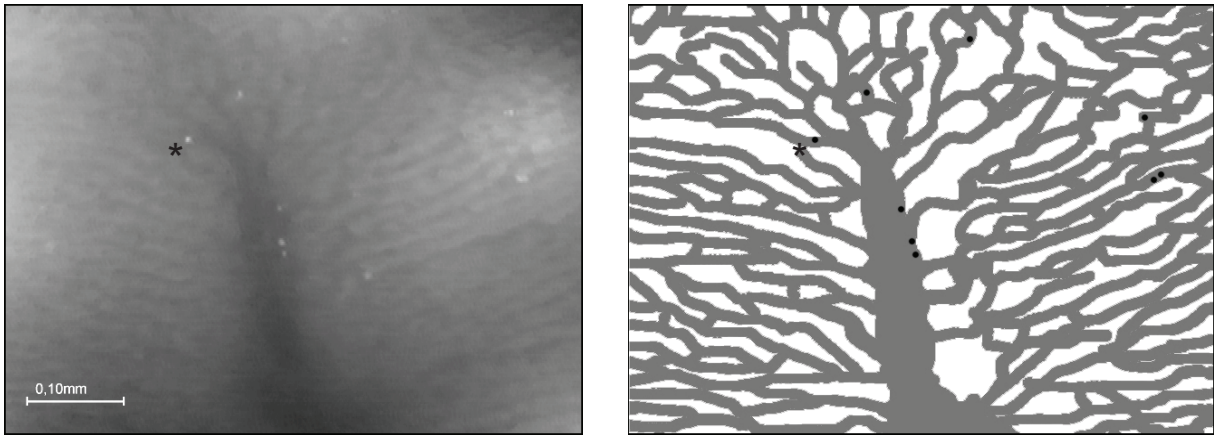
Die Visualisierung der Qualität und Quantität der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfolgte ebenfalls durch die in 4.4.3 beschriebene Rhodamin-6G-Injektion.

Die Beobachtung der Interaktion von Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel erfolgte nun in postsinusoidalen Venolen der Leber (Abbildung 14a, 14b). Die Manteloberfläche (A_M) des untersuchten Gefäßabschnitts wurde mittels der Gleichung: $A_M=l*(d_1+d_2+\ldots+d_n)/n$ bestimmt. Hierbei ist die Länge (l) eine imaginäre in den Gefäßverlauf gelegte Linie und der Durchmesser (d_n) eine definierte Anzahl zu l senkrecht verlaufender Linien, die das Gefäßlumen überspannen. Neben der Erfassung adhärenter Leukozyten erfolgte gleichzeitig die Differenzierung der Anzahl frei fließender und am Endothel entlang rollender Leukozyten. Jeder Gefäßabschnitt wurde über eine Zeitdauer von 20 Sekunden aufgenommen (Abbildung 15a, 15b). Während frei fließende Leukozyten bei der Gefäßpassage keine Interaktion mit der Gefäßwand haben, wurden die Zellen als rollend definiert, die eine imaginär durch das Gefäß gelegte Linie mit <2/5 der Geschwindigkeit der Leukozyten, die mit Zentralstromgeschwindigkeit flossen, passierten (Eipel et al., 2004; Eipel et al., 2005a). Die Anzahl rollender Leukozyten wurde als prozentualer Anteil der Gesamtzahl fließender Leukozyten pro untersuchtem Gefäßsegment angegeben.



a *b*

Abbildung 14: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer postsinusoidalen Venole (V) (a) und schematische Darstellung (b) mit eingezeichneter Gerade für den Gefäßdurchmesser (d_n) und die untersuchte Gefäßlänge (l). Visualisierung der zuführenden Lebersinusoide nach Anfärbung mit Natrium-Fluoreszein (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ------- 100 µm).*



a *b*

Abbildung 15: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Momentaufnahme (a) und schematische Darstellung (b) einer postsinusoidalen Venole. Visualisierung einzelner Lebersinusoide mit Leukozyten (Beispiel *) nach Negativkontrastierung der Gefäße mit Na-Fluoreszein und Anfärbung der Leukozyten mit Rhodamin-6G (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ——— 100 µm).*

4.4.5 Sinusoidale Makrophagen

Die Quantifizierung sinusoidal lokalisierter aktivierter Kupfferzellen und deren zonale Verteilung im Leberazinus als Indikator der inflammatorischen Antwort erfolgte indirekt nach intraarterieller Injektion und Adhärenz/Phagozytose von fluoreszierenden Latexpartikeln (Fluoresbrite YG 1.0; $6x10^8$/kg KG in 0,5 ml isotonischer NaCl-Lösung, 1,0 µm, Blaufilter: Anregung/Emission 450-490 nm/>520 nm) (Abbildung 16).

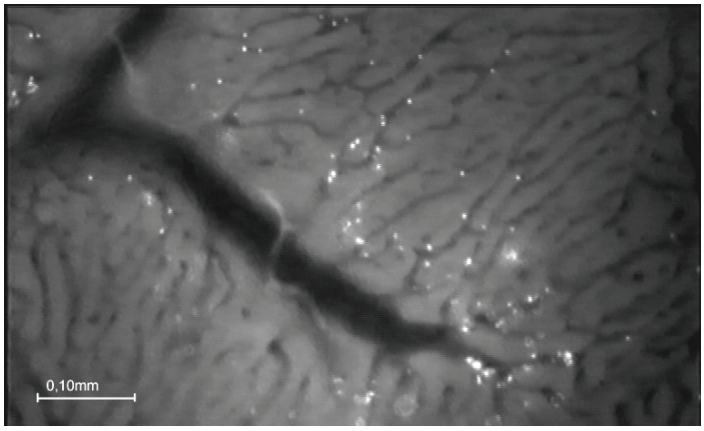


Abbildung 16: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der hepatischen Mikrozirkulation nach intraarterieller Injektion und Adhärenz von fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln. In wenigen Fällen verläuft die zuführende Portalvenole parallel zur Leberoberfläche und kann (wie in diesem Beispiel) visualisiert werden. Der unter physiologischen Bedingungen herrschende Gradient adhärenter Latexpartikel von periportal über midzonal nach perizentral von 4:3:2 wird aufgrund der Visualisierung der periportalen Region deutlich (Kontrastverstärkung mittels Natrium-Fluoreszein; Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ——— 100 µm).*

Die Beobachtung der Latexpartikel erfolgte nach 10 Minuten Rezirkulation in den Sinusoiden der Leberläppchen. Jedes Beobachtungsareal wurde über einen Zeitraum von mindestens 5 Minuten aufgenommen. Die Erfassung phagozytierter Latexpartikel durch aktivierte Kupfferzellen und deren zonale Verteilung erfolgte in den Sinusoiden der Leberazini. Als phagozytiert wurden Beads definiert, die ihre Position innerhalb des Beobachtungsfeldes und während des Beobachtungszeitraums nicht änderten. Die Anzahl aktivierter Kupfferzellen (d.h.

Zelle, die einen Bead phagozytierten) wurde pro untersuchtem Beobachtungsareal durch manuelles Auszählen ermittelt und als Anzahl pro mm² Leberoberfläche angegeben.

Die Sinusoide eines jeden Azinus wurden in 3 Abschnitte gleicher Länge unterteilt. Somit konnte eine periportale, midzonale und perizentrale Zone unterschieden werden (Abbildung 17). Es erfolgte die Erfassung der phagozytierten Latexpartikel durch aktivierte Kupfferzellen in jeder dieser Zonen. Die Anzahl aktivierter Kupfferzellen wurde pro untersuchter Zone durch manuelles Auszählen ermittelt und als Prozent aller im Azinus sichtbaren Partikel angegeben (Vollmar et al., 1996).

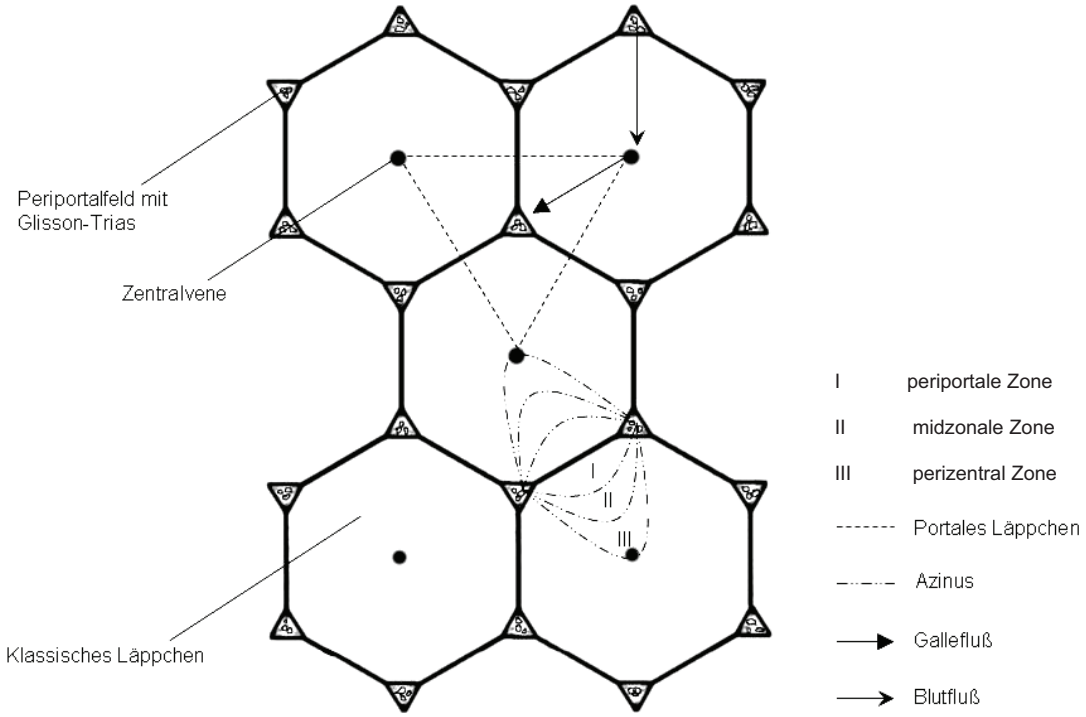


Abbildung 17: *Schematische mikrostrukturelle Darstellung und Gliederung des Lebergewebes. Die Glisson-Trias beinhaltet V. interlobularis, A. interlobularis und Gallengang. Das klassische Leberläppchen besteht aus 3 bis 6 Periportalfeldern. Im klassischen Leberläppchen bildet die Zentralvene den Mittelpunkt, der Blutfluss ist aus der Glisson-Trias zur Zentralvene hin gerichtet. Nährstoffreiches, sauerstoffarmes Blut fließt via Vena portae → V. interlobularis → Zentralvene; sauerstoffreiches, nährstoffarmes Blut via Arteria hepatica → A. interlobularis → Zentralvene. Das Portale bzw. Periportale Leberläppchen stellt den Drüsencharakter in den Vordergrund. Die in den Hepatozyten gebildete Galle fließt durch die Gallenkapillaren in den Gallengang der Glisson-Trias. Beim Leberazinus fließt das Blut aus zwei periportalen Feldern in Richtung der Zentralvene. Hier gibt es drei Zonen, durch die das Blut gelangt. Die Zonen I, II, III nehmen hierbei unterschiedliche Stoffwechselvorgänge wahr.*

4.4.6 Venuläre Phagozytose

Desweiteren wurde als Maß für die Aktivierung von Makrophagen/Kupfferzellen in den postsinusoidalen Venolen die Anzahl adhärenter Latexpartikel bestimmt.

Jeder Gefäßabschnitt wurde über einen Zeitraum von mindestens 20 Sekunden aufgenommen. Als phagozytiert wurden Partikel definiert, die über einen Zeitraum von 20 Sekunden ihre Position beibehielten.

Die Anzahl statischer Latexpartikel/Kupfferzellen pro untersuchtem Venolenabschnitt wurde durch manuelles Auszählen ermittelt und als Anzahl pro mm² angegeben. Die Endotheloberfläche wurde aus Gefäßdurchmesser und –länge des untersuchten Segments berechnet, wobei eine zylindrische Geometrie angenommen wurde.

4.4.7 Apoptotische Hepatozyten und Kolokalisation mit aktivierten Kupfferzellen

Als Maß für die Schädigung der Leber infolge LPS-Exposition diente die quantitative Erfassung der apoptotischen Hepatozyten. Die Visualisierung apoptotischer Zellen erfolgte nach intravenöser Injektion von Bisbenzimid (10 µmol/kg KG, UV-Filter: Anregung/Emission 330-380 nm/>425 nm). Dieser Farbstoff interkaliert in Adenin- und Thymin-reiche Regionen der DNA und färbt so die Zellkerne von Zellen an (Eipel et al., 2004).

Apoptotische Zellen sind durch eine Kondensation, Fragmentation und halbmondförmige Formation des Chromatins charakterisiert (Abbildung 18). Dies führt zu einer unterschiedlichen Anfärbung der Zellkerne. Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid kann somit aufgrund dieser Kontrastunterschiede und kernmorphologischen Differenzen zwischen apoptotischen und gesunden Zellen unterschieden werden.

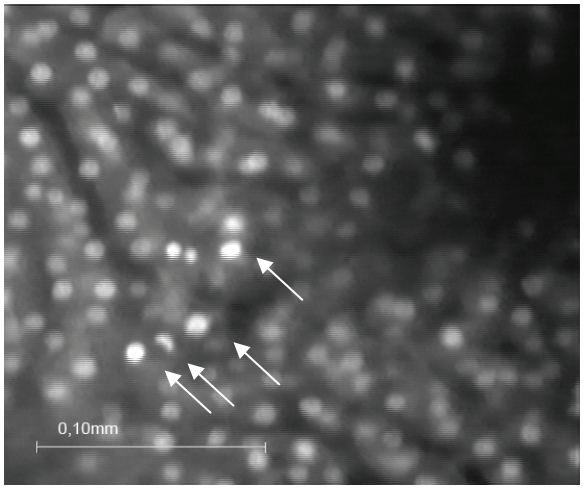
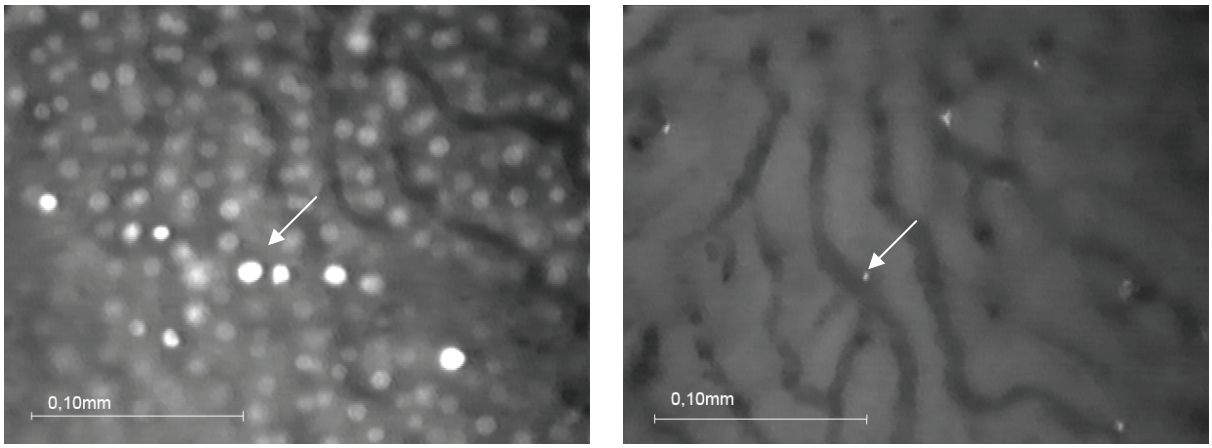


Abbildung 18: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme apoptotischer Hepatozyten nach intravenöser Injektion von Bisbenzimid. Visualisierung der Kondensation und halbmondförmigen Formation des Chromatins (Beispiel →); Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ------ 100 µm).*

Die Darstellung aktivierter Kupfferzellen erfolgt wie in 4.4.5 dargestellt mittels Latexpartikel.

Um die Anzahl apoptotischer Zellen zu quantifizieren, wurden pro Versuch in randomisierter Abfolge 10 Gesichtsfelder einerseits zur Visualisierung der apoptotischen Zellen mit dem UV-Filter, andererseits zur Darstellung aktivierter Kupfferzellen mit dem Blaufilter unmittelbar nacheinander mit dem 40x Wasser-Immersionsobjektiv aufgenommen. Die Anzahl apoptotischer Hepatozyten bzw. aktivierter Kupfferzellen wurde pro mm² errechnet. Die Analyse kolokalisierter Zellen erfolgte im Bild zu Bild Vergleich (Abbildung 19), wobei eine unmittelbare räumliche Beziehung von apoptotischen Hepatozyten und Kupfferzellen als Kolokalisation definiert wurde. Die Anzahl der Kolokalisation wird als Prozent aller apoptotischen Hepatozyten angegeben.



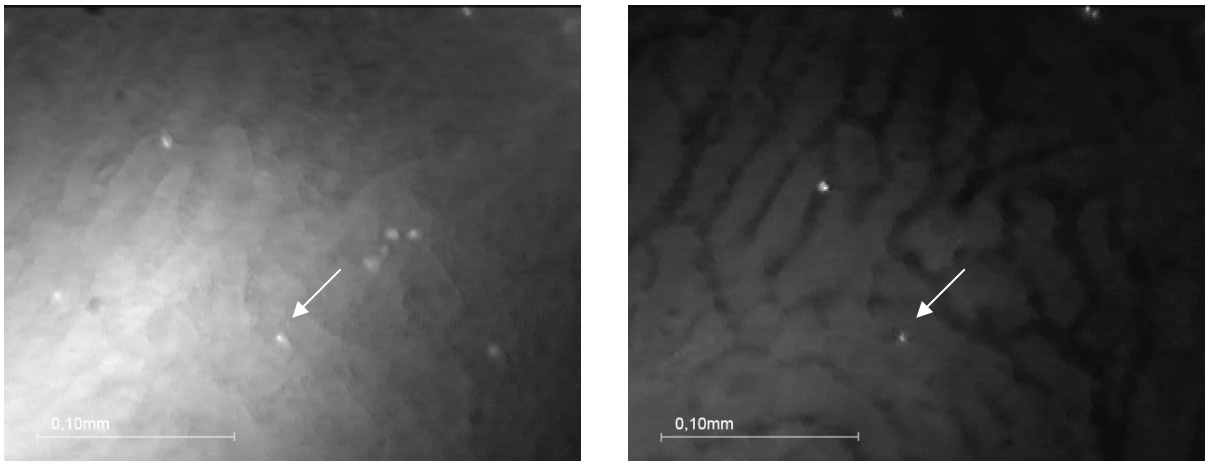
a b

Abbildung 19: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme apoptotischer Hepatozyten (a) nach Färbung mit Bisbenzimid und aktivierter Kupfferzellen (b) nach Visualisierung mittels fluoreszierender Latexpartikel nach LPS-Applikation. Die Abbildungen zeigen das gleiche Beobachtungsareal, in dem eine Kolokalisation eines apototischen Hepatozyten und einer Kupfferzelle beobachtet werden kann (→) (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ------- 100 µm).*

4.4.8 Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen mit Leukozyten

Als Indikator für die Immunreaktionen innerhalb der Leber infolge LPS-Exposition diente die quantitative Erfassung der aktivierten Kupfferzellen und stagnierenden Leukozyten. Die Darstellung aktivierter Kupfferzellen erfolgte wie in 4.4.5 dargestellt mittels fluoreszierender Latexpartikel und die Visualisierung von Leukozyten wie in 4.4.3 beschrieben mittels Rhodamin-6G.

Um die Anzahl der Kolokalisationen von Kupfferzellen und Leukozyten zu quantifizieren, wurden pro Versuch in randomisierter Abfolge 10 Gesichtsfelder einerseits zur Visualisierung der Leukozyten mit dem Grünfilter, andererseits zur Darstellung aktivierter Kupfferzellen mit dem Blaufilter unmittelbar nacheinander mit dem 40x Wasser-Immersionsobjektiv aufgenommen. Die Anzahl stagnierender Leukozyten bzw. aktivierter Kupfferzellen wurde pro mm² errechnet. Die Analyse kolokalisierter Zellen erfolgte im Bild zu Bild Vergleich (Abbildung 20), wobei eine unmittelbare räumliche Beziehung von Leukozyten und Kupfferzellen als Kolokalisation definiert wurde.



a *b*

Abbildung 20: *Auflicht-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme stagnierender Leukozyten (a) nach Färbung mit Rhodamin-6G und aktivierter Kupfferzellen (b) nach Visualisierung mittels fluoreszierender Latexpartikel nach LPS-Applikation. Die Abbildungen zeigen das gleiche Beobachtungsareal, in dem eine Kolokalisation eines Leukozyten und einer Kupfferzelle beobachtet werden kann (→) (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; ——— 100 µm).*

4.5 Vollblut- und Serumanalytik

4.5.1 Hämatologische Parameter, arterielle Blutgase

Vor Beginn und nach Abschluss der intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde dem Tier Blut aus dem arteriellen Katheter entnommen. Für die Analyse der Blutgase wurde eine heparinisierte Glaskapillare mit ca. 90 µl gefüllt und anschließend mit einem Blutgasanalysegerät (Rapid Lab 348, Bayer Diagnostics, Fernwald, Deutschland) die arteriellen Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlendioxid, der pH, die Kalium- und Calciumkonzentrationen, der Hämatokrit, der Bicarbonatwert sowie der Basenüberschuss bestimmt.

Zur Erstellung des Differentialblutbildes wurde arterielles Blut in einem 200 µl EDTA-Röhrchen gesammelt und anschließend wurde mit Hilfe eines Blutanalysegerätes (KX-21, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) die systemische Lymphozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration sowie der systemische Hämatokrit bestimmt.

4.5.2 Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Serum

Zum Nachweis leberspezifischer Enzyme erfolgte die Asservierung von arteriellem Vollblut. Durch Zentrifugation (4000 x g; 10 min; Raumtemperatur) wurde Serum für die Bestimmung der Aktivität von Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) bei -20°C asserviert. Die Messung der Serum-Enzymaktivität erfolgte in einem Serumanalysegerät (Automatic Analyzer 704, Hitachi, Boehringer, Mannheim, Deutschland).

4.6 Histologie und Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten als Semi-Dünnschnitt-Präparationen. Lebergewebe der Lappen, die nicht mikroskopiert werden, wurde nach der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie entnommen und in 4% Phosphat-gepuffertem Formalin innerhalb von 2-3 Tagen fixiert und nachfolgend in Paraffin eingebettet.

4.6.1 TUNEL-Analyse zum Nachweis der hepatozellulären Apoptose und ED1 als Makrophagenmarker

Die in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und mit Proteinase K destruiert. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung gegen DNA-Strang-Brüche durchgeführt. Dabei wurde das ApopTag in Situ Apoptose Detektions-Kit (ApopTag, Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) verwendet. Die Visualisierung lysosomaler Antigene erfolgte indirekt durch die Markierung mit dem primären monoklonalen Maus Anti-Ratten ED1 Antikörper (ED1 Serotec MCA 341R, Serotec, Raleigh, NC, USA) und dem sekundären monoklonalen Ziegen Anti-Maus/Ratten Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) und anschließender Visualisierung mittels Fuchsin als Chromogen (Fuchsin Substrat Chromogen, DAKO, Hamburg, Deutschland). Nach Färbung mit Hämalaun nach Meyer wurden die Schnitte eingebettet.

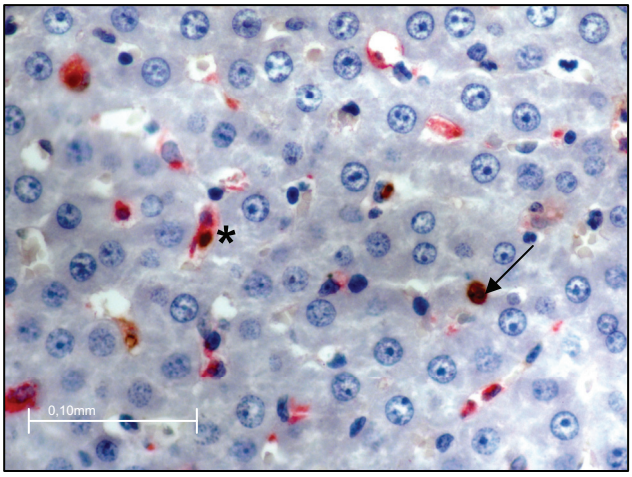


Abbildung 21: *Lichtmikroskopische Abbildung einer Simultanfärbung des Lebergewebes mit dem in Situ Apoptose Detektions-Kit (TUNEL) (Beispiel →) und dem monoklonalen Maus Anti-Ratten ED1 Antikörper (Beispiel *). Die Abbildung zeigt apoptotische Hepatozyten (→) und Kupfferzellen (*).*

4.6.2 Auswertung der Schnittpräparate

Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte an einem Zeiss Mikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines 40x Objektives (Achroplan, 0,65NA).

Die gefärbten Semi-Dünnschnitt-Präparationen wurden einzeln ausgewertet. Von jedem Schnitt wurden 30 Gesichtsfelder (HPF) ausgezählt und die Anzahl ED1- und ApopTag-positiv gefärbter Zellen pro HPF bestimmt. Gleichzeitig wurde die Anzahl von Kolokalisationen apoptotischer Hepatozyten und aktivierter Kupfferzellen erfasst.

4.7 Experimentelles Protokoll

Ziel der Untersuchung war es, mikrozirkulatorische Schäden der Leber, die Folge einer durch LPS induzierten Sepsis sind, näher zu charakterisieren und zu analysieren. Ferner war die Leukozytenkinetik und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, welche Ausdruck der Abwehrreaktion sind, sowie eine Interaktion von aktivierten Kupfferzellen bzw. Leukozyten und apoptotischen Hepatozyten quantitativ zu erfassen.

4.7.1 Versuchsgruppen

Es erfolgte bei insgesamt 16 Tieren eine Applikation von LPS in einer Konzentration von 10 mg/kg KG. Hierbei wurde bei 10 Tieren LPS intraperitoneal appliziert. 6 Stunden nach LPS-Exposition erfolgte der chirurgische Eingriff, wie unter 4.3 ausführlich beschrieben. Des weiteren wurden 6 Tiere 16 Stunden nach intravenöser LPS-Injektion präpariert und untersucht.

Kontrolltiere erhielten eine intravenöse bzw. intraperitoneale Injektion äquivalenter Volumina physiologischer NaCl-Lösung. Die Anzahl der mit NaCl-Lösung behandelten Tiere betrug 4 für die intraperitoneale und 5 für die intravenöse

Injektion. Die chirurgische Präparation der Kontrolltiere erfolgte nach dem identischen Protokoll.

4.7.2 Versuchsablauf

Während der chirurgischen Präparation, die detailliert in 4.3 dargestellt wurde, erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der systemischen Hämodynamik (Herzfrequenz, arterieller Blutdruck). Basale Messungen, wie die Bestimmung der Blutgase und der Vollblutparameter erfolgten unmittelbar nach der Präparation der Halsgefäße sowie vor und nach der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation umfassten folgende Parameter:

1) sinusoidales Perfusionsversagen (siehe 4.4.1)
2) parenchymale NADH-Autofluoreszenz (siehe 4.4.2)
3) Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (siehe 4.4.3 und 4.4.4)
4) sinusoidal und venulär lokalisierte Makrophagen (siehe 4.4.5 und 4.4.6)
5) apoptotische Hepatozyten sowie aktivierte Kupfferzellen und deren Kolokalisation (siehe 4.4.7)
6) aktivierte Kupfferzellen sowie Leukozyten und deren Kolokalisation (siehe 4.4.8)

Nach den intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgte die Bestimmung der systemischen Hämodynamik sowie die Entnahme arterieller Blutproben für die Bestimmung der Blutgase, Elektrolyte, des Blutbildes und leberspezifischer Enzyme (ASAT, ALAT). Zum Ende des chirurgischen Eingriffs wurde die Leber entnommen.

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden von Tieren jeder Gruppe Gewebepräparate angefertigt.

4.7.3 Statistik

Sämtliche Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW ± SEM) angegeben. Die Mittelwerte der einzelnen Parameter setzen sich aus den individuellen Werten der Versuchstiere zusammen. Die Werte der Kontrolltiere (intraperitoneale sowie intravenöse Injektion von physiologischer Kochsalzlösung) wurden zu einer Gruppe zusammengefasst. Dies gilt für die grafische Darstellung als auch für die statistische Evaluation.

Die statistische Evaluation erfolgte mittels des Softwarepaketes SigmaStat (Jandel Cooperation St. Rafael, CA, USA). Nach Bestätigung der Normalverteilung der Werte erfolgte der Paarvergleich (Holm-Sidak Methode, Kruskal Wallis Varianzanalyse, Mann-Whitney Ranksummentest bzw. t-Test) zwischen den einzelnen Gruppen. Unterschiede wurden bei $p<0,05$ als signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Mikrozirkulation in der Leber

5.1.1 Sinusoidales Perfusionsversagen

Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Na-Fluoreszein konnte mit Hilfe der Intravitalfluoreszenzmikroskopie die Perfusion in den einzelnen Lobuli untersucht werden. Bereits nach 6-stündiger Endotoxinämie (i.p. Injektion) konnte bei Tieren der LPS-Gruppe ein signifikanter Anstieg nicht-perfundierter Sinusoide auf 17,5 ± 3,4% im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe (0,8 ± 0,26%) beobachtet werden. Nach 16-stündiger Endotoxinämie (i.v. Injektion) verschlechterte sich die nutritive Perfusion bei Tieren der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe noch weiter und betrug 20,5 ± 3,4%.

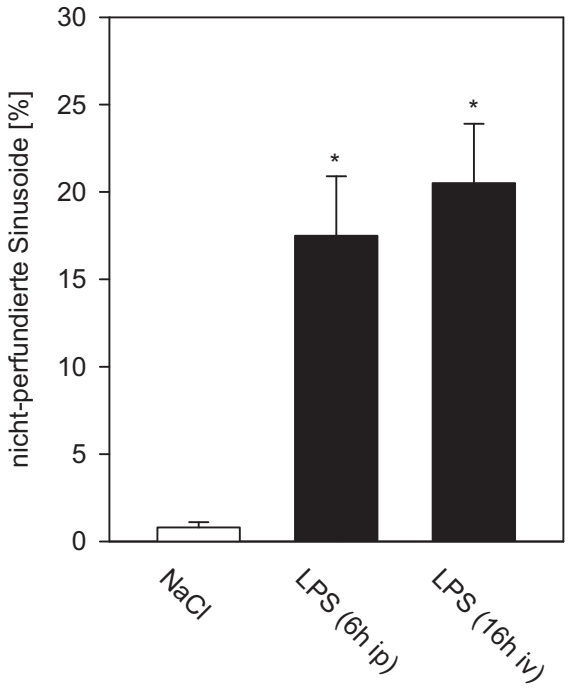


Abbildung 22: *Anzahl nicht-perfundierter Sinusoide (relativ zur Gesamtzahl aller sichtbaren Sinusoide, die eine virtuelle Linie kreuzen) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n = 6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM. Kruskal Wallis Varianzanalyse: * p<0,05 vs NaCl.*

5.1.2 Gewebeoxygenierung (parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz)

Die zelluläre Sauerstoffversorgung als Folge der nutritiven Perfusion korreliert negativ mit dem zellulären NADH-Gehalt. Die parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz wird zu Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen im UV-Filter noch vor Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe erfasst. Sowohl 6 h (103,5 ± 9,8 r.E.) als auch 16 h (90,7 ± 9,8 r.E.) nach LPS-Exposition war im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (83,5 ± 6,1 r.E.) eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der NADH-Autofluoreszenz im Sinne einer Gewebehypoxie zu verzeichnen.

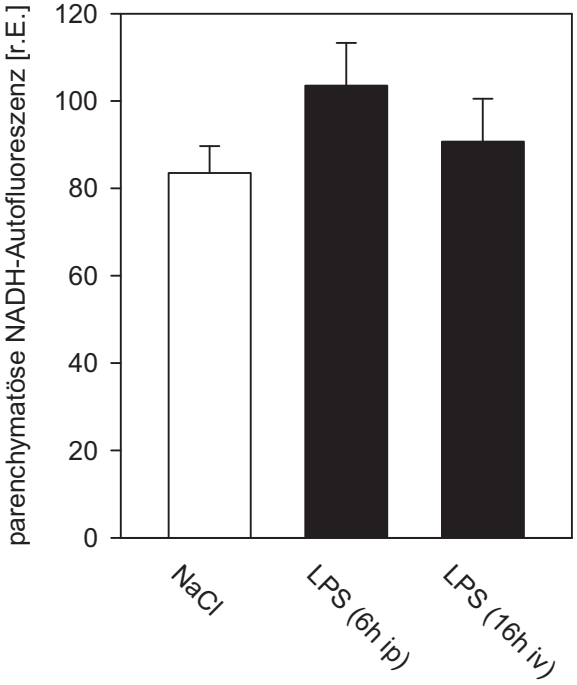


Abbildung 23: *Parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz (Indikator der Gewebeoxygenierung) in relativen Einheiten für 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n = 6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM.*

5.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Leber

5.2.1 Venuläre Leukozytenkinetik

Mittels i.v.-Applikation von Rhodamin-6G zur in vivo Färbung von Leukozyten wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postsinusoidalen Venolen untersucht.
Jeder Gefäßabschnitt wurde über eine Zeitdauer von 20 Sekunden aufgenommen. Während frei fließende Leukozyten bei der Gefäßpassage keine Interaktion mit der Gefäßwand haben, wurden die Zelle als rollend definiert, die eine imaginär durch das Gefäß gelegte Linie mit ≤2/5 der Geschwindigkeit der Leukozyten, die mit Zentralstromgeschwindigkeit flossen, passierten. Leukozyten, die sich nicht fortbewegten, wurden als adhärent definiert.
Sowohl nach 6- als auch nach 16-stündiger LPS-Exposition konnte eine Zunahme der Zell-Zell-Interaktionen beobachtet werden, wobei die Fraktion rollender Leukozyten 6 h (23,7 ± 3,5%) und 16 h (20,0 ± 1,8%) nach LPS-Exposition gegenüber der Kontrollgruppe (9,4 ± 2,3%) signifikant erhöht waren (Abbildung 24a).

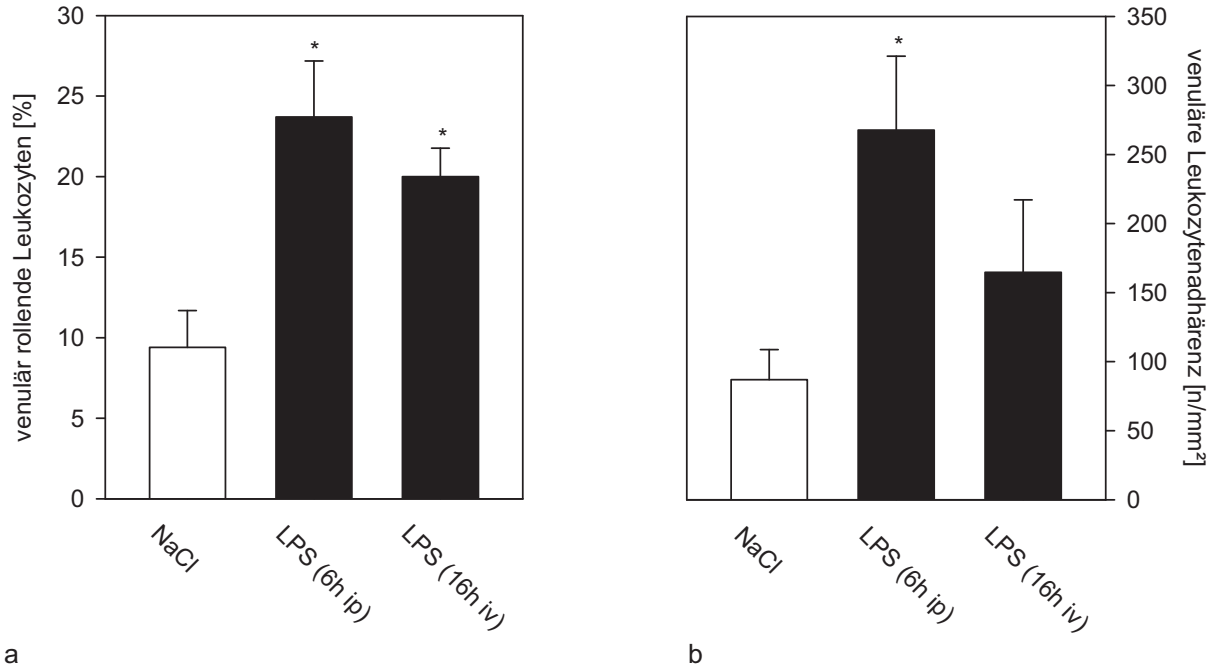


Abbildung 24: *Prozentualer Anteil (a) langsam am Endothel postsinusoidaler Venolen entlang rollender Leukozyten (relativ zur Gesamtzahl aller bewegten Leukozyten) und (b) Anzahl adhärenter Leukozyten am mikrovaskulären Endothel postsinusoidaler Venolen (angegeben als Zellen pro mm²) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n = 6) nach*

*i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM. Holm-Sidak Test: * p<0,05 vs NaCl.*

Weiterhin kam es zu einem Anstieg der venulären Leukozytenadhärenz mit einer signifikanten Erhöhung der Leukozytenzahl 6h nach Induktion der Endotoxinämie (267,7 ± 53,5mm^{-2}) und einer weniger starken Zunahme nach 16-stündiger Endotoxinämie (164,6 ± 52,5mm^{-2}) gegenüber der Kontrollgruppe (86,9 ± 21,8mm^{-2}) (Abbildung 24b).

5.2.2 Sinusoidale Leukozytenkinetik

Die Analyse der sinusoidalen Leukozytenadhärenz zeigte 6 Stunden nach LPS-Applikation (61,0 ± 12,3mm^{-2}) eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe (37,0 ± 8,6mm^{-2}) und der Gruppe mit 16-stündiger Endotoxinämie. Nach 16-stündiger Endotoxinämie (27,5 ± 3,8mm^{-2}) zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme der Leukozytenadhärenz, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 25).

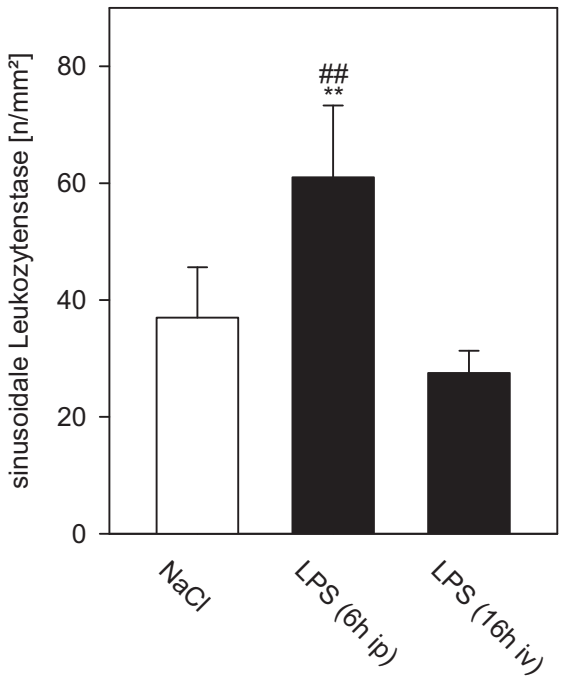


***Abbildung 25**: Sinusoidale Leukozyten-Stase (angegeben als Zellen pro mm²) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n = 6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9;). Mittelwert ± SEM. Holm-Sidak Methode: ** p<0,05 vs NaCl. Holm-Sidak Test: ## p<0,05 vs LPS (16h iv).*

5.3 Hepatozelluläre Apoptose

5.3.1 Apoptotische Parenchymschäden in der Leber

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der hepatozellulären Apoptose zeigt sowohl 6 (3,5 ± 0,8mm^{-2}) als auch 16 Stunden (3,4 ± 0,6mm^{-2}) nach LPS-Applikation ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Hepatozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (2,0 ± 0,8mm^{-2}). Eine Zunahme der Apoptoserate von der 6- zur 16-stündigen Endotoxinämie war nicht zu beobachten.

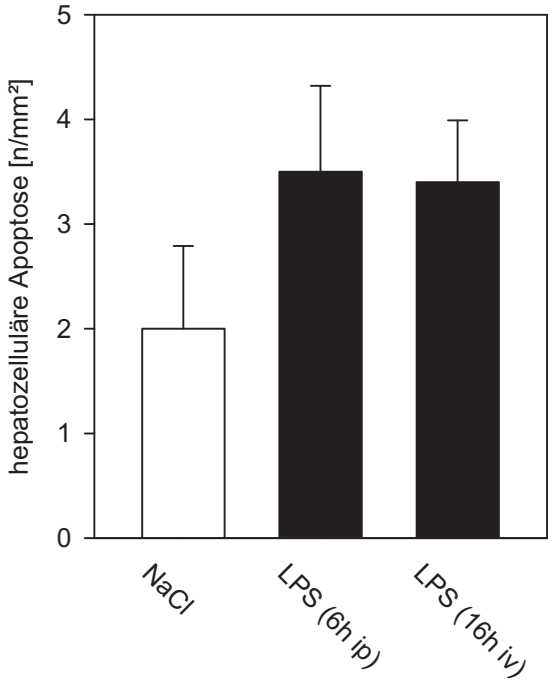


Abbildung 26: *Hepatozelluläre Apoptose (angegeben als Zellen pro mm²) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n = 6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM.*

5.3.2 Nachweis von apoptotischen Hepatozyten mit der TUNEL-Analyse

Mittels immunochemischer Färbung mit der TUNEL-Analyse wurde die hepatozelluläre Apoptose quantifiziert.

Die Analyse der hepatozellulären Apoptose ergab nach 6-stündiger Endotoxinämie (10,5 ± 1,1mm^{-2}) einen signifikanten Anstieg und nach 16 Stunden (6,9 ± 0,8mm^{-2}) eine leichte Erhöhung der hepatozellulären Apoptose gegenüber der Kontrollgruppe (4,2 ± 0,7mm^{-2}).

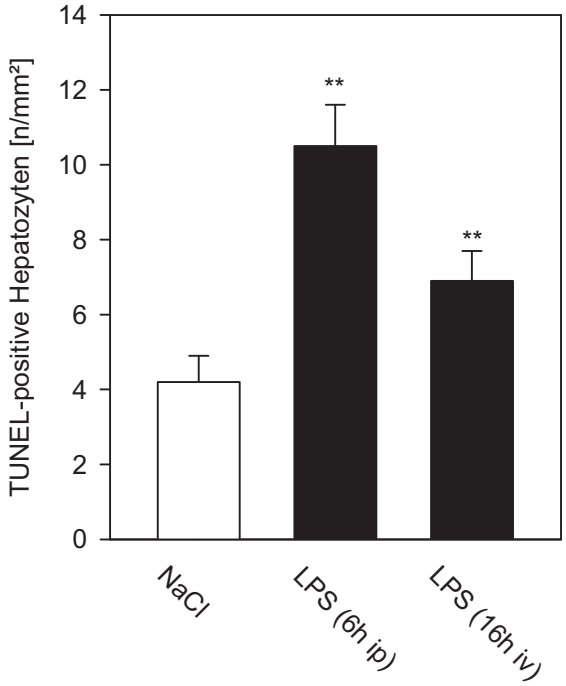


Abbildung 27: *Mittels TUNEL-Analyse nachgewiesene hepatozelluläre Apoptose (angegeben als Zellen pro mm²) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n = 6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9;). Mittelwert ± SEM. T-Test und Mann-Whitney Ranksummentest: ** p<0,05 vs NaCl.*

5.4 Kupfferzellen

5.4.1 Phagozytoseleistung der Kupfferzellen und die zonale Verteilung in den Sinusoiden

Zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität leberständiger Makrophagen wurden während der intravitalmikroskopischen Aufnahmen Fluoreszein-markierte Latexpartikel (Latexbeads) intraarteriell injiziert. Als phagozytiert wurden Beads definiert, die ihre Position innerhalb des Beobachtungsfeldes und während des Beobachtungszeitraums (mindestens 5 Minuten) nicht änderten. Die Zahl der phagozytierten Latexpartikel ging als Prozentzahl aller im jeweiligen Gesichtsfeld sichtbaren Partikel in die Analyse ein.

Die Auswertung der Aufnahmen ergab eine deutliche Erhöhung der Anzahl adhärenter Latexpartikel 6 Stunden nach LPS-Injektion und im Gegensatz dazu eine Erniedrigung adhärenter Latexpartikel 16 Stunden nach Injektion gegenüber der Kontrolle. Die Veränderungen nach 6-stündiger Endotoxinämie waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant (Abbildung 28a).

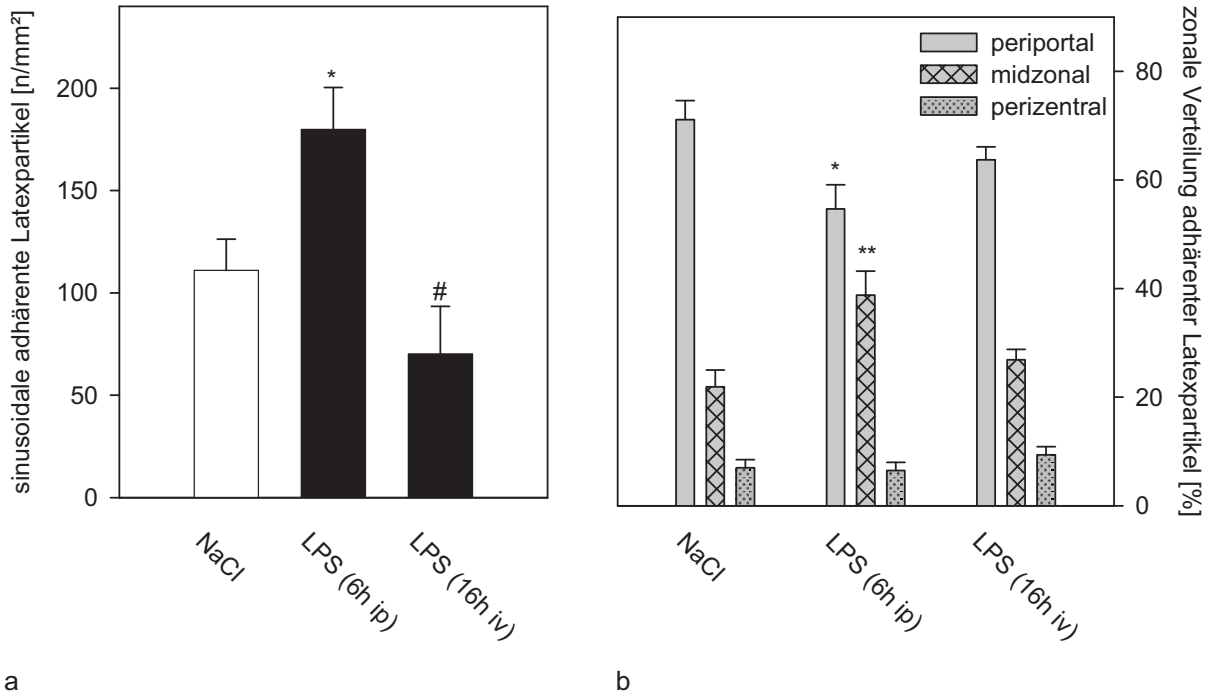


Abbildung 28: *(a) Sinusoidal adhärente Latexpartikel (angegeben als Zellen pro mm²) und (b) deren zonale Verteilung in den Sinusoiden (angegeben als prozentualer Anteil an der Gesamtzahl adhärenter Partikel) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n=6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM. Holm-Sidak Test * p<0,05 vs NaCl, ** p<0,01 vs NaCl, # p<0,05 vs LPS (6 h ip).*

Anhand der Analyse konnte eine Veränderung der zonalen Verteilung phagozytierter Latexpartikel erfasst werden. So kam es sowohl nach 6- als auch 16-stündiger Endotoxinämie zu einer Verschiebung der Phagozytose von Latexpartikeln in die peripheren Sinusoidabschnitte. 6 Stunden nach LPS-Injektion konnte gegenüber der Kontrolle eine signifikante Zunahme phagozytierter Partikel in der midzonalen Zone beobachtet werden. Diese war durch eine Umverteilung der Phagozytoseleistung von periportal nach midzonal gekennzeichnet und fiel 6 Stunden nach LPS-Injektion gegenüber der Kontrolle signifikant aus. 16 Stunden nach induzierter Endotoxinämie konnte gegenüber der Kontrolle eine leichte Abnahme der periportalen Phagozytoseleistung und resultierend eine geringfügige Zunahme phagozytierter Latexpartikel midzonal und perizentral bei insgesamt verringerter Phagozytoseleistung beobachtet werden (Abbildung 28b).

5.4.2 Nachweis von Kupfferzellen mit der ED1-Färbung

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Kupfferzell-Zahl erfolgte der Nachweis mittels ED1-Antikörper. Nach 6-stündiger Endotoxinämie (14,1 ± 1,1mm^{-2}) konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl ED1-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle (13,5 ± 1,7mm^{-2}) festgestellt werden. Die Anzahl ED1-positiver Zellen war 16 Stunden (21,5 ± 1,8mm^{-2}) nach LPS-Injektion deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht (Abbildung 29).

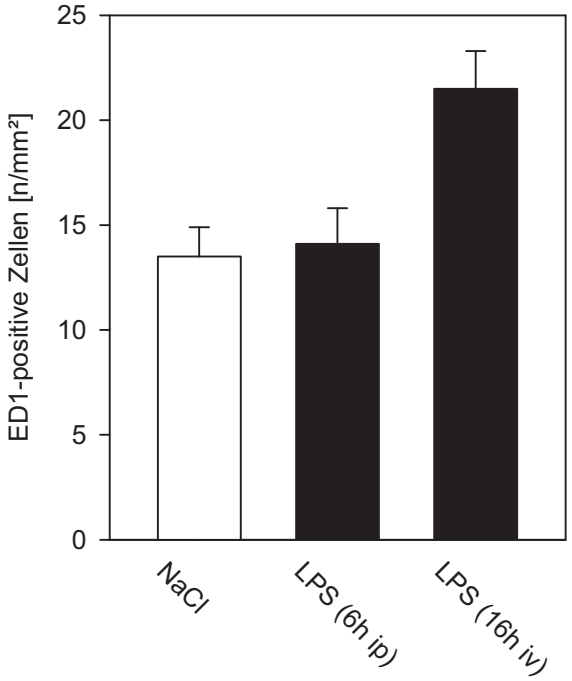


Abbildung 29: *ED1-positive Zellen (angegeben als Zellen pro mm²) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n=6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM.*

5.5 Kolokalisation von apoptotischen Hepatozyten und Kupfferzellen

Die Analyse der Kolokalisation apoptotischer Hepatozyten und aktivierter Kupfferzellen erfolgte zum einen mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und zum anderen mittels der immunhistochemischen Färbung mit ED1-Antikörpern zum Nachweis von Kupfferzellen und TUNEL-Markierung zur Visualisierung apoptotischer Hepatozyten.

Mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie konnte keine Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen mit apoptotischen Hepatozyten in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu führte die 6- und 16-stündige Endotoxinämie zu einer Kolokalisation beider Zelltypen. Die Kolokalisation von Kupfferzellen mit apoptotischen Hepatozyten betrug nach 6 Stunden 8,0 ± 4,5% bei allen im Beobachtungsfeld sichtbaren apoptotischen Hepatozyten (Abb 30a). Im Gegensatz hierzu waren lediglich 1,3 ± 0,6% aller sichtbaren aktivierten Kupfferzellen in direkter Nachbarschaft mit apoptotischen Hepatozyten zu sehen (Abbildung 30b). 16 Stunden nach LPS-Injektion war die Zahl der Kolokalisationen weniger stark ausgeprägt und durch eine direkte Nachbarschaft von 5,4 ± 2,5% aller sichtbaren apoptotischen Hepatozyten sowie 0,9 ± 0,4% aller im Beobachtungsfeld lokalisierter Kupfferzellen gekennzeichnet (Abbildung 30b).

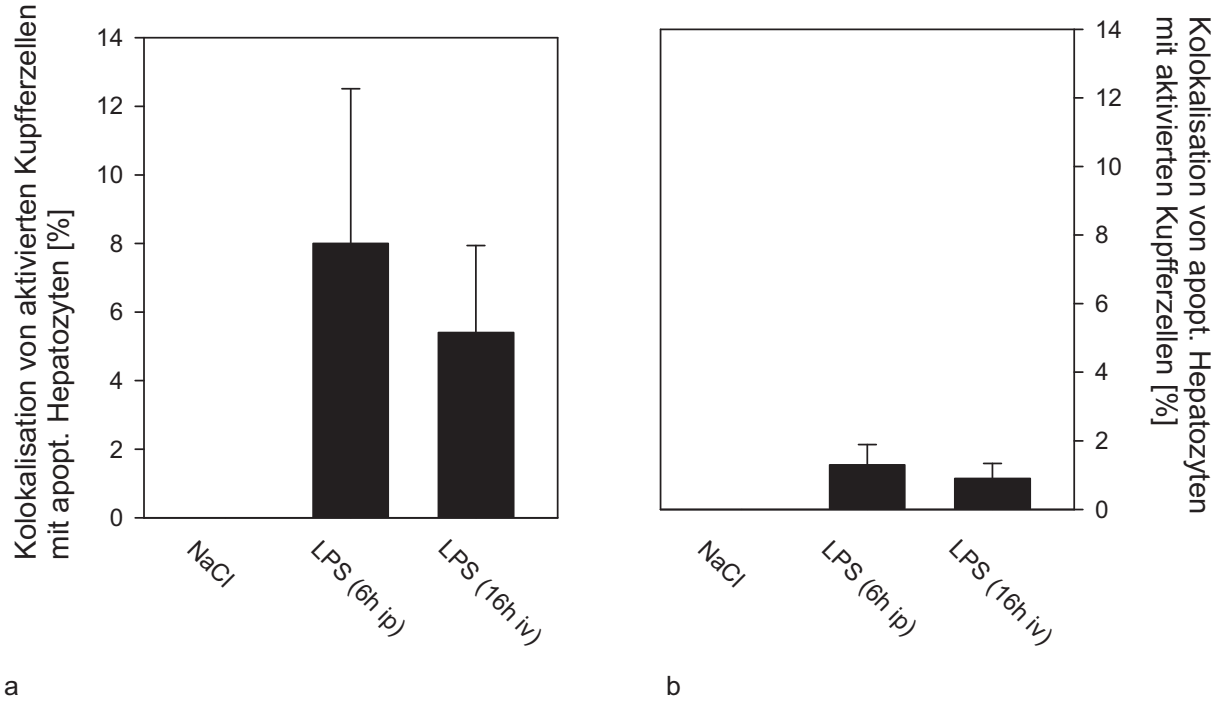
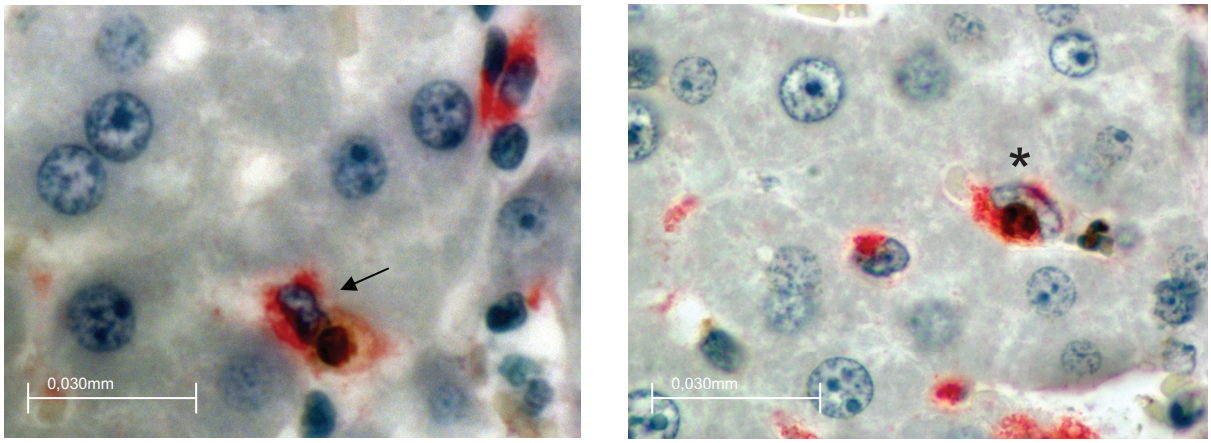


Abbildung 30: *Kolokalisation aktivierter Kupfferzellen mit apoptotischen Hepatozyten ausgehend von (a) apoptotischen Hepatozyten und (b) aktivierten Kupfferzellen (angegeben als prozentualer Anteil) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n=6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM.*

Oben genannte Beobachtung des vermehrten Auftretens von Kolokalisationen von Kupfferzellen und apoptotischen Hepatozyten konnte auch durch die immunhistochemische Färbung mit ED1-Antikörper und gleichzeitige TUNEL-Analyse bestätigt werden. Weiterhin ließ sich die direkte Nachbarschaft von Kupfferzellen und apoptotischen Hepatozyten, die Phagozytose apoptotischer Hepatozyten durch Kupfferzellen und die Endozytose mit resultierender Zellvergrößerung von Kupfferzellen visualisieren (Abbildung 31).



a b

Abbildung 31: *Lichtmikroskopische Bilder einer Simultanfärbung des Lebergewebes mit dem In situ apoptosis detection kit assay (TUNEL) und dem monoklonalen Maus anti-Ratte ED1 Antikörper. Dargestellt sind verschiedene Stadien der Zell-Zell-Interaktion. Es sind die Aufnahme und Einverleibung von apoptotischen Hepatozyten durch Kupfferzellen(→) (a) und die Endozytose von apoptotischen Hepatozyten mit Größenzunahme der Kupfferzellen (*) (b) abgebildet (x100 Öl-Immersionsobjektiv).*

Die quantitative Analyse der Kolokalisationen von Kupfferzellen und apoptotischen Hepatozyten unter Kontrollbedingungen zeigte nur eine geringe Anzahl in direkter Nachbarschaft liegender ED1-positiver Zellen und TUNEL-positiver Hepatozyten (Abbildung 32). Sowohl 6 als auch 16 Stunden nach LPS-Exposition kam es zu einem deutlichen Anstieg um das 5- bis 10-fache der Zell-Zell-Interaktionen.

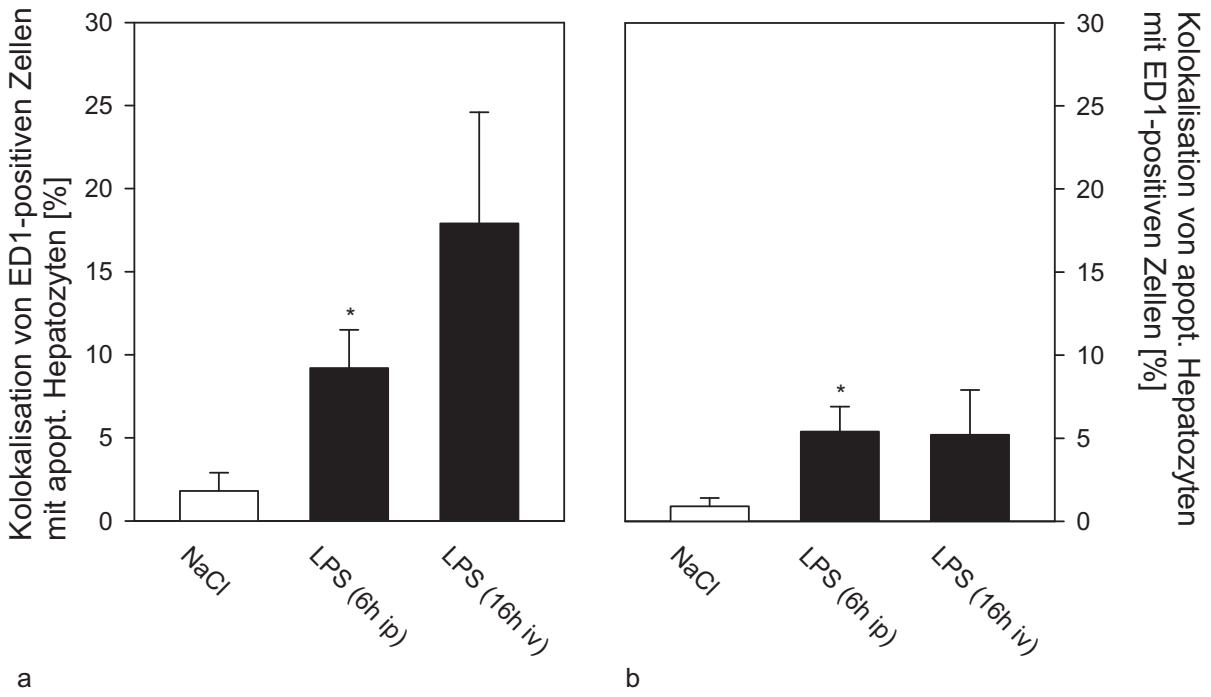


Abbildung 32: *Kolokalisation ED1-positiver Zellen (aktivierte Kupfferzellen) mit apoptotischen Hepatozyten ausgehend von (a) apoptotischen Hepatozyten und (b) ED1-positiven Zellen (angegeben als prozentualer Anteil) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n=6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM. t-Test * p<0,05 vs NaCl.*

5.6 Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen und Leukozyten

Mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Analyse der Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen und Leukozyten.

Unter Kontrollbedingungen lagen 5,8 ± 3,8% aller sichtbaren adhärenten Leukozyten in direkter Nachbarschaft zu aktivierten Kupfferzellen und 6,6 ± 5,0% aller visualisierten adhärenten Leukozyten in Beziehung zu aktivierten Kupfferzellen.

Weder 6- noch 16-stündige LPS-Exposition beeinflußte die Zell-Zell-Interaktionen.

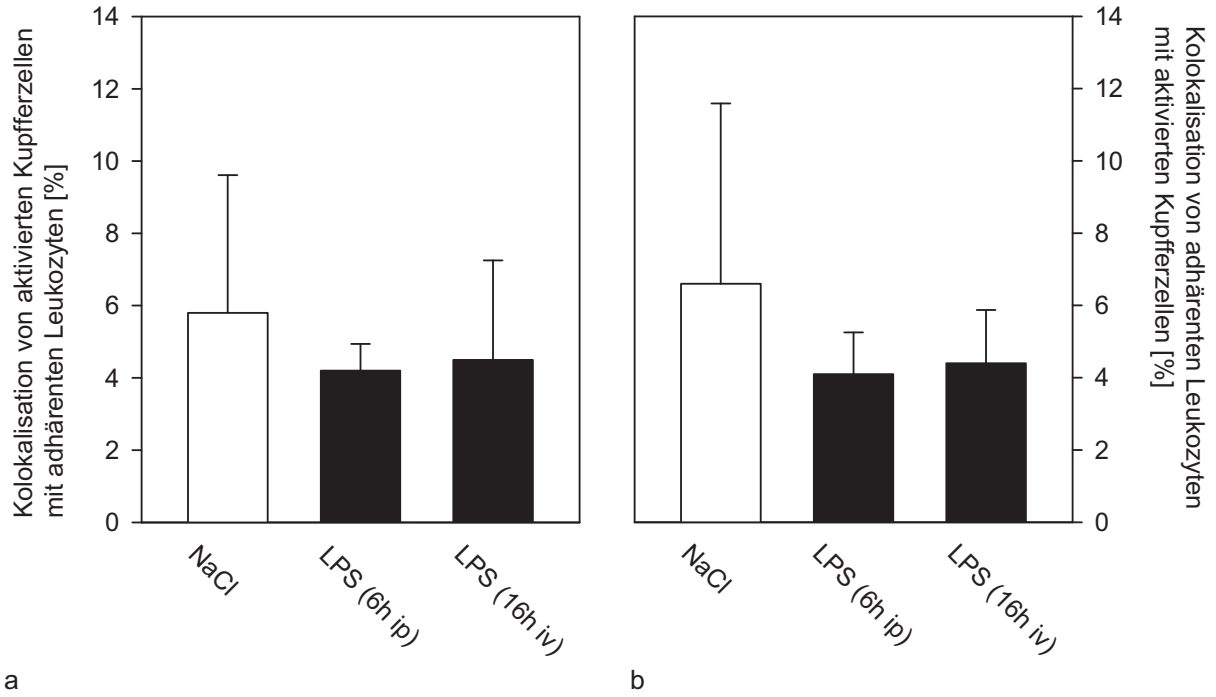
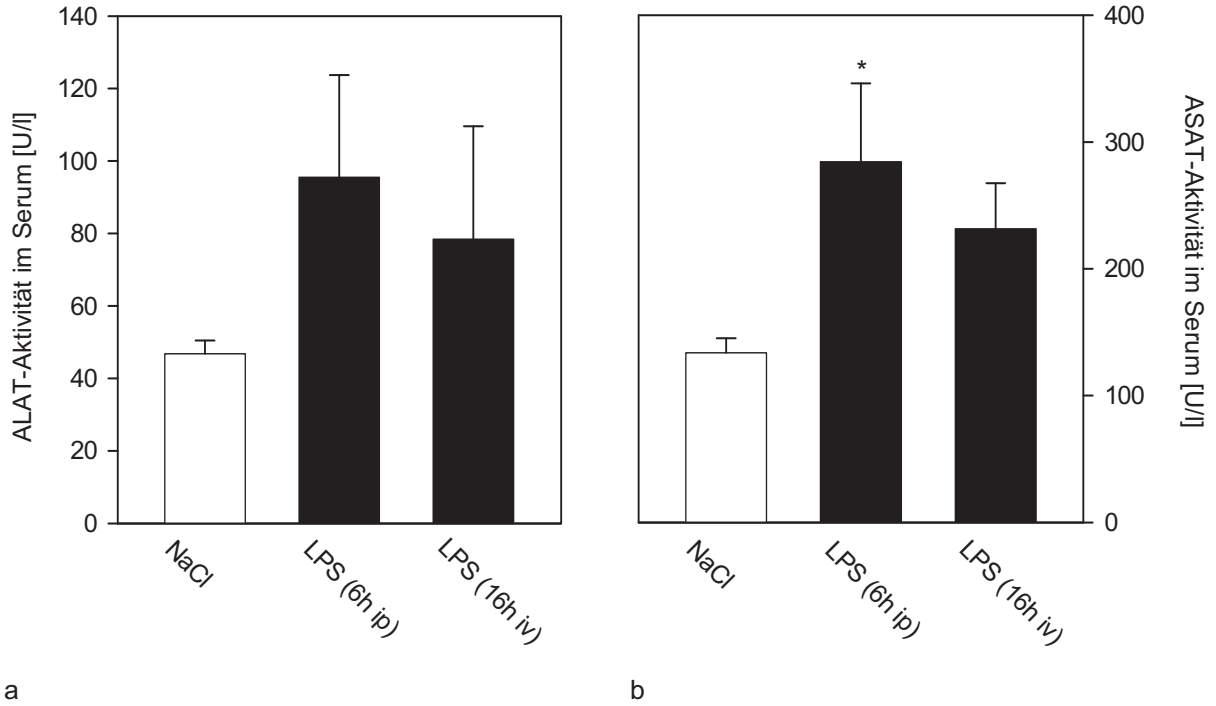


Abbildung 33: *Kolokalisation aktivierter Kupfferzellen mit adhärenten Leukozyten ausgehend von (a) adhärenten Leukozyten und (b) aktivierten Kupfferzellen (angegeben als prozentualer Anteil) 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n=6) nach i.v. Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM.*

5.7 Spezifische Enzyme im Serum

Zur Durchführung der laborchemischen Untersuchung des Serums auf die Aktivitäten der Transaminasen (ASAT, ALAT) wurden die nach Versuchsende asservierten Serumproben aufgetaut und die Serum-Aktivitäten spektrophotometrisch bestimmt (Abbildung 34).



a b

Abbildung 34: *Aktivität der (a) Alanin-Aminotransferase (ALAT) bzw. (b) Aspartat-Aminotransferase (ASAT) im Serum (angegeben in U/l) als Parameter zur Beurteilung der hepatozellulären Integrität 6 h (n = 10) nach i.p. und 16 h (n = 6) nach i.v. LPS-Exposition von E. coli LPS (10 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung). NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n = 9). Mittelwert ± SEM. Mann-Whitney Ranksummentest: * p<0,05 vs NaCl.*

Die Analyse der Serum-Aktivitäten zeigte nach 6- und 16-stündiger Endotoxinämie eine deutliche Erhöhung auf das 2- bis 3-fache der Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle, wobei die Zunahme nach 6 Stunden größer als nach 16 Stunden war. Der Anstieg der ASAT-Aktivität 6 Stunden nach LPS-Injektion war im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht.

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 Diskussion des Modells

Die vorliegende Untersuchung zur Analyse der mikrovaskulären und zellulären Veränderungen der Leber nach Induktion einer Endotoxinämie wurde an spontan atmenden, laparotomierten Ratten mit intraperitonealer Narkose durchgeführt.

Zum Studium der Pathogenese der Schädigung der Leber oder einzelner Zellpopulationen der Leber durch Endotoxin sind verschiedene Modelle etabliert. Ein wesentliches Auswahlkriterium für das Modell ist die der Studie zugrunde liegende Fragestellung, das heißt es erfolgt eine problembezogene Auswahl des Modells (Wortha und Adams, 1992). Isolierte und kultivierte Zellen ermöglichen die Beobachtung direkter Auswirkungen von Endotoxin auf die entsprechenden Zellpopulationen sowie die Analyse von Pathomechanismen Endotoxin-bedingter Zellschädigung (Mavier et al., 1988). Isoliert perfundierte Organe zeigen die Auswirkung von Endotoxin auf das gesamte Organ, unter Einbeziehung verschiedener Zellpopulationen innerhalb des Organs (Nolan und O'Connel, 1965). Nachteile der genannten in vitro- und ex vivo-Methoden mit Betrachtung isolierter Zellpopulationen oder Organe sind die fehlenden komplexen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellpopulationen eines Organs beziehungsweise zwischen verschiedenen Organen sowie die Nichterfassung systemischer Veränderungen im Rahmen der Endotoxinämie (McCuskey, 1986). Im Gegensatz hierzu bietet die Untersuchung am intakten Organismus den Vorteil, dass außer der Schädigung der Leber vor dem Hintergrund der Endotoxin-bedingten Veränderungen des gesamten Organismus auch die Beeinflussung der Leber durch andere Organsysteme erfasst werden (Vollmar et al., 1993). Das in dieser Studie gewählte in vivo-Modell ermöglicht sowohl die Betrachtung des Endotoxin-vermittelten Leberschadens als auch die Erfassung interferierender lokaler und systemischer Effekte (Menger und Lehr, 1993).

Der Nachteil der angewendeten Intravitalfluoreszenzmikroskopie besteht in der vorausgehenden chirurgischen Manipulation des Versuchstieres, die eine Narkose des Tieres zwingend erforderlich macht. Das in diesen Versuchen

verwendete Anästhetikum Pentobarbital wird nach intraperitonealer Applikation und folgender Resorption in der Leber metabolisiert. Trotz einer bekannten Induktion von leberspezifischen Enzymen und Einflüssen auf das kardiovaskuläre und respiratorische System wurde Pentobarbital vorzugsweise als Narkotikum verwendet, da es neben einer schnellen Narkoseeinleitung auch den Vorteil der Unterdrückung nozizeptiver Reflexe bietet. Das Wissen um die Enzyminduktion sollte bei der Beurteilung der laborchemischen Analyse der Transaminasen berücksichtigt werden. An der Niere und am Herz ist eine Interaktion der Barbiturate auf Ebene der Nikotin-Amid-Dinukleotid-reduzierenden Dehydrogenase mit der mitochondrialen Atmungskette gezeigt worden (Chance et al., 1962; Renault et al., 1987). Bei der Verwendung von Pentobarbital führt eine Erhöhung der verwendeten Dosis über 50 mg/kg KG zu Effekten wie Blutdruckabfall, myokardiale Insuffizienz und Atemdepression (Longneker und Seyde, 1986). In dem verwendeten Versuchsaufbau wurde die Narkose mit Hilfe der Vitalparameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Reaktion auf Schmerzreize) gesteuert und damit Nebenwirkungen aufgrund Überdosierung verhindert.

Die Intravitalfluoreszenzmikroskopie der Leber erfordert, die Tiere zu laparotomieren und den linken Leberlappen auszulagern. Diese Manipulationen führen gegebenenfalls zu einer Perfusionsveränderung der Leber (Gelman, 1976; Bohrer et al., 1981; Gelman et al., 1987). Gelman bezeichnet das chirurgische Trauma sogar als Hauptursache für eine gestörte Leberdurchblutung bei abdominellen Eingriffen. Messungen der Leberdurchblutung mit Hilfe radioaktiv markierter Mikrosphären an Ratten ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen laparotomierten und nicht-laparotomierten Tieren (Kerner, 1993).

Die Auslagerung des linken Leberlappens zur intravitalmikroskopischen Untersuchung erfolgte in Links-Seitenlage bei 45° Rotation des Leberlappens entlang der Längsachse des in Rückenlage fixierten Tieres. Der Leberlappen wurde zur Verminderung der Atemexkursion auf ein Stativ ausgelagert, zur Erreichung einer planen Untersuchungsfläche rotiert und die offenliegende Fläche mit NaCl-Lösung superfundiert sowie mit einem Deckglas abgedeckt. Bei diesem Manöver besteht prinzipiell die Möglichkeit der Beeinflussung der Leberperfusion. Vergleichende Messungen können methodenimmanent am wachen Tier (Laparotomie und

Auslagerung linker Leberlappen) nicht durchgeführt werden. Durch die Rotation des Tieres und die Auslagerung der Leber auf ein Stativ konnte eine Beeinträchtigung der Leberperfusion weitestgehend vermieden werden.

Die Endotoxinämie wurde durch eine einmalige intraperitoneale beziehungsweise intravenöse Injektion von Lipopolysaccharid von E.coli, Serotyp O128:B12, induziert. Das LPS wurde vor Applikation in steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und den Versuchstieren unter Etherkurznarkose in einer Dosis von 5 mg/kg KG appliziert. Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Leber erfolgte 6 Stunden (Vollmar et al., 2002) beziehungsweise 16 Stunden (Schaefer et al., 2003) nach der Endotoxin-Applikation über einen Zeitraum von circa 45 Minuten. In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze zur Induktion einer Sepsis. So wird neben der Coecumligatur mit anschließender Punktion (CLP) zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis (Chaundry et al., 1979) die Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP) (Weighardt et al., 2000) beschrieben. Diese Modelle dienen der Simulation einer Peritonitis und Sepsis, wie sie typischerweise nach abdominalchirurgischen Eingriffen auftreten. Hierbei bildet eine Mischflora aus Darmbakterien das Erregerspektrum. Im Gegensatz hierzu wird bei der intravenösen und intraperitonealen Injektion von LPS (Vollmar et al., 1995), Lipoteichonsäure (Kajikawa et al., 1998) oder Peptidoglykan (Vijtiuk et al., 1993) ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer oder -positiver Bakterien appliziert. Diese Methoden dienen weniger der Simulation eines bestimmten Krankheitsbildes, sondern der Induktion einer Endotoxinämie zur Aufklärung der Wirkung einzelner Toxine auf den Organismus und spezifischer Reaktionen auf zellulärer und molekularer Ebene (Jirillo et al., 2002). Die letztgenannten Modelle sind jedoch zu bevorzugen, da sie im Gegensatz zur Sepsis bei CLP bei einer geringeren Schwankungsbreite eine standardisierte Antwort bewirken.
Mehrere Studien zeigten in der Anwendung der verschiedenen Modelle zur Untersuchung der Pathophysiologie der Sepsis und des septischen Schocks widersprüchliche Ergebnisse (Papova et al., 1971; Lundsgaard-Hansen et al., 1972; Postel et al., 1975). Diese Widersprüche warfen Zweifel an der klinischen Bedeutung der Endotoxin-Injektion zum Studium der Pathogenese der Sepsis auf. In der Literatur finden sich auch widersprüchliche Aussagen zu Art und Dauer (Bolus

Injektion versus langsame Infusion) der LPS-Applikation (Petrucco et al., 1972; Postel et al., 1975).
Grund des in dieser Studie benutzten Modells mit intraperitonealer bzw. intravenöser Bolus-Injektion von LPS ist die Standardisierbarkeit, die einfache Durchführung unter Etherkurznarkose und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien (Li et al., 2004; Eipel et al., 2004).

6.1.2 Diskussion der Untersuchungsmethoden

Als Untersuchungstechnik wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt, die im Gegensatz zu zahlreichen anderen Untersuchungstechniken wie Laser-Doppler Flowmetrie (Arvidsson et al., 1988) oder der Mikrosphären-Technik (Vollmar et al., 1992) den Vorteil der direkten Visualisierung und Analyse der oberflächlichen Mikrozirkulation bietet. Mit ihrer Hilfe können die Durchblutung von Arteriolen, Kapillaren und Venolen dargestellt und dynamische Veränderungen innerhalb der Mikrostrombahn beobachtet werden (Menger et al., 1991). Hierin ist die intravitale Fluoreszenzmikroskopie den oben genannten indirekten Verfahren als direkte Methode überlegen.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Leber ist seit der Erstbeschreibung durch Knisely (Knisely, 1936; Knisely, 1939) eine etablierte Untersuchungsmethode, die bislang an verschiedenen Tiermodellen wie Mäusen (Rappaport, 1977), Hamstern und Ratten (Menger et al., 1991) sowie Kaninchen (McCuskey, 1966) und Großtieren, wie Hunden und Affen (Bloch, 1955) angewandt wurde.

Neben der Epi-Illumination steht noch die Technik der Trans-Illumination zur Verfügung, welche jedoch sehr dünne Gewebedicken erfordert, was die Untersuchung der Leber auf die äußersten 0,5-1 mm des Leberlappenrandes beschränkt. Hierdurch würde zum einen die Zahl untersuchbarer Azini limitiert, zum anderen ist die Untersuchung des Leberrandes durch mögliche Gewebealterationen im Rahmen mechanischer Manipulationen der Auslagerung und durch mögliche Austrocknung während der Mikroskopie in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Weiterhin ist - physiologisch bedingt - die Perfusion der Sinusoide in den Randbereichen der Leber reduziert (Eguchi et al., 1991).

Nur die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen und die Durchführung der Epi-Illuminationstechnik erlaubt die intravitalmikroskopische Untersuchung größerer Leberareale mit gleichzeitiger quantitativer Analyse sowohl mikrozirkulatorischer Parameter als auch zellulärer Mechanismen. Ein relevanter Parameter der nutritiven Perfusion ist die Bestimmung der sinusoidalen Perfusionsrate nach Kontrastfärbung des Parenchyms mittels Na-Fluoreszein. Nach Mikroskopie mehrerer Lobuli und Aufnahme auf Videoband erfolgte die off-line Analyse. Die Auswertung der hepatischen Mikrozirkulation erfolgte mit Hilfe standardisierter Schablonen, die auf den Monitor aufgelegt wurden und definierte Lobulus-Segmente markierten. Mittels der Schablone, die eine zonale Unterteilung der Lobuli nach Rappaport (Rappaport, 1973) ermöglichte, erfolgte eine Auswertung verschiedener Parameter innerhalb der drei Zonen (periportal, midzonal, perizentral). In der vorliegenden Studie wurde in der midzonalen Zone der prozentuale Anteil nicht-perfundierter Sinusoide betrachtet. Hierzu wurde bei der off-line Auswertung midzonal eine virtuelle Linie senkrecht zur Blutflussrichtung gezogen. Die Anzahl der perfundierten und nicht-perfundierten diese Linie senkrecht kreuzenden Sinusoide wurde bestimmt und zueinander in Relation gesetzt. Diese Methode der quantitativen Erfassung der Mikrozirkulation wurde bereits im Rahmen verschiedener Untersuchungen wie Endotoxinämie (Vollmar et al., 1993; Vollmar et al., 2002), Ischämie/Reperfusion (Vollmar et al., 1994) und Lebertransplantation (Post et al., 1992) wiederholt angewandt.

Resultante der nutritiven Perfusion ist die Gewebeoxygenierung. Diese kann mit Hilfe der intravitalmikroskopischen Analyse der Leberoberfläche ohne vorherige Anfärbung im UV-Licht beurteilt und quantifiziert werden (Burkhardt et al., 1998). Grundlage dieses Verfahrens ist die Autofluoreszenz von NADH, welches bei der Beleuchtung mit ultraviolettem Licht angeregt wird und unter Zerfall der Doppelbindungen seinerseits Licht emittiert. NADH akkumuliert im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung bei mangelnder Sauerstoff-Versorgung der Zelle. Die emittierte Lichtmenge entspricht dem Gewebegehalt an NADH, welcher negativ proportional mit der Gewebeoxygenierung korreliert. Die Autofluoreszenz kann nach Ausbleichen der ebenfalls unter UV-Beleuchtung fluoreszierenden Ito-Zellen densitometrisch gemessen werden. Die Quantifizierung erfolgt in arbiträren Einheiten (Vollmar et al., 1997).

Zur Untersuchung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie kann der Farbstoff Rhodamin-6G zur in vivo-Färbung genutzt werden. Nach intravitaler Applikation kumuliert Rhodamin-6G in Granula von Leukozyten und Thrombozyten. Die Illumination der Leber mit Licht der Wellenlänge 530-560 nm (Vollmar et al., 1994b; Vollmar et al., 2002; Eipel et al., 2004) im Grünlicht-Filter erlaubt die selektive Beurteilung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Die Leukozytenstase bzw. -adhärenz wurde in den hepatischen Sinusoiden und den postsinusoidalen Venulen quantitativ ausgewertet. Die direkte Visualisierung der dynamischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie und deren Aufzeichnung auf Videokassette erlaubt eine wiederholte off-line Analyse und Auswertung der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung. Die Differenzierung von Leukozyten und Thrombozyten erfolgte anhand der Zellgröße. Innerhalb der Sinusoide wurde die Leukostase untersucht, wobei diejenigen Leukozyten als stagnierend definiert wurden, welche sich während des Beobachtungszeitraumes von 20 Sekunden nicht bewegten (Vollmar et al., 1994c; Schaefer et al., 2003; Eipel et al., 2004). Dieselbe Definition wurde zur Untersuchung der Leukozyten-Adhäsion in postsinusoidalen Venulen angewandt (Eipel et al., 2004).

Zur Untersuchung des apoptotischen Zelltodes wurde den Untersuchungstieren Bisbenzimid (Hoechst 33342) intravenös appliziert. Dieser Farbstoff färbt in vivo die Nuclei der Hepatozyten und ermöglicht unter Verwendung eines UV-Filters die Beurteilung der Kernmorphologie und der Chromatinkondensation (Hacker, 2000). Damit wird eine Aussage über den apoptotischen Zelltod von Hepatozyten ermöglicht. Die intravitalmikroskopische Untersuchung des apoptotischen Zelltodes ist eine standardisierte Methode und sowohl in vitro (Boer, 2003), ex vivo (El-Gibaly et al., 2004) als auch in vivo (Schaefer et al., 2003) anwendbar. Es ist gezeigt worden, dass die hepatozelluläre Apoptose ein früher und möglicherweise sogar kausaler Faktor des entzündlichen Leberversagens (Leist et al., 1995) und des Ischämie/Reperfusionsschadens (Rudiger et al., 2003) ist. Somit ist die Untersuchung des apoptotischen Zelltodes von Bedeutung. Ebenfalls ist bekannt, dass apoptotische Hepatozyten chemotaktisch auf Neutrophile wirken und somit die Entzündungsreaktion im Rahmen einer Sepsis verstärken können (Lawson et al.,

1998). Die so rekrutierten Leukozyten emigrieren in das Leberparenchym und tragen ihrerseits durch Freisetzung toxischer Mediatoren zum zellulären Schaden bei.

Die Visualisierung der Kupfferzellen und deren Phagozytoseaktivität erfolgte indirekt, indem den Versuchstieren eine standardisierte Menge (6 x 10^8/kg KG) (Vollmar et al., 1994a) fluoreszierender Latex-Partikel intraarteriell appliziert wurde. Diese Partikel mit einem Durchmesser von 1.1 µm werden von den Kupfferzellen phagozytiert. Die Geschwindigkeit der Elimination der Partikel aus dem Blut lässt Rückschlüsse auf die Phagozytoseleistung der Kupfferzellen zu. Es ist bekannt, dass die Kupfferzell-Phagozytoseaktivität bei Ischämie/Reperfusion der Leber (Vollmar et al., 1994a) unterdrückt wird und dass eine Blockade der Kupfferzellen durch Gadolinium-Chlorid ($GdCl_3$) die Leber gegen einen deletären LPS-induzierten parenchymatösen Schaden schützt (Vollmar et al., 1996).

Um die Ergebnisse der Intravitalmikroskopie zu verifizieren, wurden aus dem nach Versuchsende asservierten Gewebe histologische Präparate gefertigt und mit ApopTag/TUNEL Analyse bzw. monoklonalem Maus Anti-Ratten ED1 Antikörper visualisiert.

In der Literatur finden sich Beschreibungen verschiedener Methoden zum Nachweis hepatozellulärer Apoptose. So steht eine rein morphologische Begutachtung der Zellkerne am HE-Schnitt (Jaeschke et al., 2001) verschiedenen biochemischen Verfahren, wie z.B. immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten gegen Enzyme, die während des apoptotischen Zelltodes aktiv sind (Caspasen), sowie dem Nachweis von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Analyse) (Kohli et al., 1999) gegenüber.

Makrophagen stellen eine heterogene Gruppe von Zellen unterschiedlicher Morphologie, Biochemie, Funktion, sekretorischer Produktion und Oberflächenphänotypen dar (Adams und Hamilton, 1984; Hirsch und Gordon, 1982; Twomey et al., 1983; Unanue et al., 1984). Diese Charakteristika bedingen den Gesamtphänotyp der Makrophagen, welcher sich je nach Lokalisation in verschiedenen Organen unterscheidet. Die Expression der Marker, welche durch monoklonale Antikörper identifiziert werden können, ist aufgrund der Lokalisation der Makrophagen in verschiedenen Geweben unterschiedlich (Dijkstra et al., 1985; Ishii

et al., 1984; Robinson et al., 1986). Die Visualisierung der Lebermakrophagen erfolgte mittels immunhistochemischer ED1-Färbung, da sie die Mehrheit sowohl der Gewebs- als auch der freien Makrophagen erfasst (Dijkstra et al., 1985).

Als Apoptose bezeichnet man den genetisch programmierten Zelltod. In der Literatur ist eine Vielzahl von Methoden zum Nachweis der Apoptose beschrieben (Strange et al., 1995; Sgonc et al., 1994; Darzynkiewicz et al., 1994). Die Apoptose ist unter anderem durch komplexe zelluläre Vorgänge wie Zellschrumpfung, Chromatinmargination, Membran-Blebbing, Kernkondensation und -segmentierung sowie den Zerfall in Apoptosekörperchen, die phagozytiert werden können (Darzynkiewicz et al., 1997; Kerr und Harmon, 1991; Majno und Joris 1995), charakterisiert. Der DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen folgen innerhalb von Stunden der Zelltod und die Phagozytose der Restkörperchen (Bursch et al., 1990). Der Nachweis von DNA-Fragmentierung erfolgt in der vorliegenden Studie über die Markierung freier 3'-OH-Enden in DNA-Strangbrüchen mittels modifizierter Nukleotide unter Nutzung des ApopTag in Situ Apoptose Detektions-Kits (Gavrieli et al., 1992). Hierbei werden sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektiert (Majno und Joris, 1995). Eine medikamenteninduzierte Schädigung der DNA, außer wenn sie mit Apoptose einhergeht (Chapman et al., 1995), sowie normale bzw. proliferierende Kerne werden nicht angezeigt. Noch bevor es zum Untergang des Nucleus, dem Hauptmerkmal der Apoptose, kommt, kann der Nachweis von Chromatinkondensation und DNA-Strangbrüchen mittels ApopTag-Färbung zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Apoptose erfolgen (Anttanasio und Schiffer, 1995; Chapman et al., 1995).

Als Nachweis der zellulären Integrität und des Ausmaßes des hepatozellulären Schadens wurden die Lebertransaminasen im Serum spektrophotometrisch bestimmt. Eine Erhöhung der Transaminasenkonzentration weist auf eine gestörte zelluläre Integrität der Hepatozyten, die das Übertreten der zytoplasmatischen Enzyme in das Blut ermöglicht und sich dort bei jeder zellulären Schädigung findet, hin. Ein fortgeschrittener Zellschaden, wie Zellnekrose, kann laborchemisch durch eine Konzentrationserhöhung mitochondrialer Enzyme nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass der Übertritt zytoplasmatischer Enzyme in das Blut über eine akute vaskuläre Freisetzung stattfindet, welche jedoch nicht automatisch mit einem Zelluntergang einhergeht (Nishimura et al., 1986). So ist eine Erhöhung der

Konzentration zytosolischer Enzyme auch bei reversiblen Zellschädigungen nachweisbar und somit auch zum Nachweis akuten oder temporären Zellschadens oder einer Störung der Zellmembran-Integrität geeignet.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Auswertung der leberspezifischen Enzyme im Serum ergab zu beiden untersuchten Zeitpunkten nach LPS-Exposition gegenüber Tieren der Kontrollgruppe erhöhte Enzymaktivitäten. Es ist bekannt, dass eine gesteigerte Serumaktivität der Transaminasen eine hepatozelluläre Funktionsschädigung bis hin zum Zelluntergang anzeigen kann (Nishimura et al., 1986).

Die systemische Endotoxinämie führte nach 6 und 16 Stunden zu einer massiven Beeinträchtigung der sinusoidalen Perfusion mit Perfusionsausfällen von 17,5% bzw. 20,5%. Diese deutliche Beeinträchtigung der Mikrozirkulation spiegelt sich auch in einer Erhöhung der NADH-Werte wider, welche als Indikator der aus der Mikrozirkulationsstörung resultierenden Gewebshypoxie dienen.
Es ist bekannt, dass die Störung der Mikrozirkulation signifikant zur Manifestation des Organversagens beiträgt (Vollmar et al., 1993). Als Ursache hierfür wird ein Zusammenspiel von Obstruktion der Sinusoide durch Mikrothromben (Kuroe et al., 1991) oder Leukozyten (Ferguson et al., 1993), Verlegung des sinusoidalen Lumens durch Schwellung (Leaf, 1973) von Endothelzellen (Vollmar et al., 1994a), Kupfferzellen (McCuskey et al., 1982; McCuskey et al., 1983) und Hepatozyten (Clemens et al., 1985) sowie Widerstandserhöhung durch sinusoidale Vasokonstriktion (Bauer et al., 1994b) diskutiert.

Begleitend zur Mikrozirkulationsstörung der Leber konnte eine ausgeprägte inflammatorische Antwort auf das injizierte Endotoxin beobachtet werden, welche durch eine mikrovaskuläre Leukozytenrekrutierung charakterisiert wurde. Sowohl nach 6- als auch 16-stündiger Endotoxinämie konnten zum Teil massive Ansammlungen von Entzündungszellen entsprechend zahlreicher anderer Studien beobachtet werden (Vollmar et al., 1993). In den postsinusoidalen Venolen kam es zu einem signifikant vermehrten Auftreten rollender („primäre“ Interaktion mit dem

Endothel) und adhärenter („sekundäre“ Interaktion) Leukozyten, deren Interaktion mit dem Endothel als zwingende Voraussetzung der transendothelialen Migration und Infiltration in das Gewebe gilt (von Adrian et al., 1991). Eine signifikante Erhöhung der sinusoidalen Leukozyten-Stase, welche nach 6-stündiger Endotoxinämie beobachtet werden konnte, entspricht Ergebnissen anderer Studien unserer Arbeitsgruppe (Eipel et al., 2004). Im Widerspruch hierzu steht die verminderte sinusoidale Leukozyten-Stase 16 Stunden nach LPS-Exposition. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die Applikationsart, intraperitoneal vs. intravenös, Einfluss auf die systemische bzw. lokale Stimulation der Entzündungsreaktion und organspezifischen Leukozytenrekrutierung hat.
Im Gegensatz zur Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den postsinusoidalen Venolen, sind in sinusoidalen Gefäßabschnitten die Selektine ELAM-1 und CD62 nicht an der „primären“ Zell-Zell-Interaktion (‚rolling’) beteiligt (Steinhoff et al., 1993).

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen ergab 6 Stunden nach LPS-Applikation eine signifikant erhöhte Anzahl aktiver Kupfferzellen mit einer Verschiebung des zonalen Gradienten adhärenter Latexpartikel in midzonale Abschnitte der Sinusoide zu Ungunsten der Adhärenz in periportalen Abschnitten. Die Verschiebung des Gradienten konnte auch in weniger starker Ausprägung nach 16-stündiger Endotoxinämie beobachtet werden.

Der zonale Gradient, d.h. die bevorzugte periportale Adhärenz von Latexpartikeln entlang der Sinusoide der Leber unter physiologischen Bedingungen, resultiert aus der raschen proximalen Adhärenz bei der ersten Passage der Latexpartikel (‚first pass effect’) und ist somit nicht beweisend für eine höhere Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen in der periportalen Zone gegenüber der midzonalen sowie perizentralen Zone. An der isoliert perfundierten Leber konnte nachgewiesen werden, dass die Phagozytose von Latexpartikeln periportal höher ist, wenn das Verhältnis adhärenter zu zirkulierenden Partikeln betrachtet wird (Te Koppele und Thurman, 1990). Die Verschiebung der Adhärenz der Latexpartikel nach „stromabwärts“, wie nach 6- und 16-stündiger Endotoxinämie beobachtet werden konnte, ist daher Indikator einer reduzierten Aktivität von Kupfferzellen in proximalen Gefäßabschnitten mit erhöhter Rekrutierung midzonaler bzw. perizentraler Kupfferzellen.

Bei Verlängerung der Endotoxinämiedauer mit beobachteter Abnahme der absoluten Anzahl adhärenter Latexpartikel kann eine Schädigung bzw. Einschränkung der Kupfferzellaktivität vermutet werden, ähnlich wie sie in Modellen der Ischämie und Reperfusion beschrieben wurde (Crafa et al., 1991). Möglicherweise ist auch eine LPS-bedingte Verringerung der hepatischen Clearance und Begünstigung einer Translokation von Bakterien des intestinalen Lumens in das portale Venensystem (Deitch et al., 1987) mit resultierender Absättigung der Phagozyten mit Opsoninen (Saba, 1970) von Bedeutung.
Die immunhistochemische Untersuchung mittels ED1-Färbung ergab 16 Stunden nach LPS-Applikation eine deutliche Erhöhung der Anzahl ED1-positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe und einer 6-stündigen Endotoxinämie. Wird von einer gleich großen Anzahl ortsständiger Makrophagen/Kupfferzellen in den 3 Untersuchungsgruppen ausgegangen, kann nach 16-stündiger Endotoxinämie eine Zunahme der Anzahl eingewanderter Makrophagen angenommen werden, da der ED1-Antikörper an Antigene ortsständiger als auch eingewanderter Makrophagen bindet (Dijkstra et al., 1985). Als Ursache ist ein direkter Zusammenhang zwischen endotoxämischer Stimulationsdauer und Makrophagenrekrutierung als Ausdruck der körpereigenen Immunabwehr zu sehen. Die Makrophagenpopulation der Leber ist bedeutend für die Elimination des zirkulierenden LPS (Uchikura et al., 2004). Sie antwortet auf diesen Stimulus mit einer Expression und Induktion inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF-α, IL-6) und einer Vielzahl von Mediatoren, wie reaktiven Sauerstoffspezies, Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) und FAS Liganden (Uchikura et al., 2004; Jaeschke et al., 2002; Canbay et al., 2003; Gregory und Wing, 2002; Papathanassoglou et al., 2000).

Die Apoptose als Ausdruck des genetisch programmierten Zelltodes wurde anfangs als nicht-inflammatorisches Ereignis, welches ohne weitere Konsequenzen für das umliegende Gewebe verläuft, charakterisiert. Unter pathophysiologischen Bedingungen wurde deutlich, dass die hepatozelluläre Apoptose chaotisch und nicht-selektiv abläuft und wesentlich zur Entzündungsreaktion der Leber beitragen kann (Canbay et al., 2003).

Der Endotoxin-bedingte parenchymatöse Schaden, welcher durch Zellkerndegeneration, -kondensation, Kern-DNA-Degradation und Phagozytose von

Zellbestandteilen gekennzeichnet ist (Haslett und Savill, 2001), konnte intravitalmikroskopisch durch die Manifestation der Apoptose-spezifischen kernmorphologischen Veränderungen nachgewiesen werden und zeigte sich zu beiden Zeitpunkten der Endotoxinämie in einer erhöhten Anzahl apoptotischer Hepatozyten. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten anderer Studien der eigenen Arbeitsgruppe (Eipel et al., 2004) und konnte zusätzlich durch die histochemische Färbung mittels ApopTag-Antikörper gefestigt werden. Nach 6- und 16-stündiger Endotoxinämie zeigte sich eine Zunahme TUNEL-positiver Hepatozyten. Die nicht-signifikant erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Hepatozyten nach 16-stündiger Endotoxinämie kann auf eine weit fortgeschrittene zelluläre Desintegration hinweisen, welche eine Anfärbbarkeit mittels ApopTag/TUNEL-Analyse verhindert. Die gesteigerte Makrophagenrekrutierung trägt ihererseits zu einer raschen Elimination apoptotischer Hepatozyten bei und könnte somit die Reduktion der Zahl an TUNEL-positiven Hepatozyten nach 16-stündiger Endotoxinämie mitverursacht haben.

Simultan zu Abräumvorgängen apoptotischer Hepatozyten durch Kupfferzellen wird die Expression von Apoptose-induzierenden Liganden stimuliert. Diese ‚Todesrezeptoren' bewirken ihrerseits eine Förderung der hepatozellulären Apoptose im Sinne eines circulus vitiosus (Canbay et al., 2003).

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass der hepatozelluläre Zelltod ein komplexes Zusammenspiel parenchymaler und nicht-parenchymaler Leberzellen ist und häufig durch eine Kooperation der Zellen verursacht wird (Dini et al., 2002). In dieser hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Kolokalisation apoptotischer Hepatozyten mit aktivierten Kupfferzellen in LPS-exponierten Tieren. Im Gegensatz hierzu zeigte die Anzahl der Kolokalisationen von stagnierenden Leukozyten in den Sinusoiden und aktivierten Kupfferzellen nach LPS-Exposition keinen wesentlichen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Jaeschke und Smith zeigten bereits die Bedeutung der direkten Adhäsion von Leukozyten und Hepatozyten für die Vermittlung des Parenchymzellschadens der Leber. Genaue Mechanismen der Adhäsion und Signalwege bleiben weiterhin jedoch unklar (Jaeschke und Smith, 1997). An der isoliert perfundierten Rattenleber konnte durch Sindram et al. gezeigt werden, dass Kupfferzellen an dem durch Leukozyten und Plättchen vermittelten Leberschaden beteiligt sind (Sindram et al., 2001). Die

Autoren schlussfolgerten, dass die Interaktion zwischen Kupfferzellen, Plättchen und Leukozyten essentiell in der Vermittlung des Reperfusionsschadens ist. Dies erklärt möglicherweise, warum in vorangegangenen Studien, welche Modelle mit blutfreiem Perfusat nutzten, die Kupfferzell-Depletion keinen Einfluss auf den Ischämie/Reperfusions-Schaden hatte (Imamura et al., 1995; Reinders et al., 1997). An LPS- und IL-1-behandelten Mäusen konnte elektronenmikroskopisch eine Translokation von Plättchen in hepatische Sinusoide und weiterführend in den Disse-Raum beobachtet werden. Von dort traten einige dieser Zellen in Kontakt mit Hepatozyten. Diese Translokation konnte nicht an Kupferzell-depletierten Mäusen beobachtet werden (Nakamura et al., 1998). Weiterhin wurde berichtet, dass die Adhäsion zwischen aktivierten Kupfferzellen und Endothelzellen in den hepatischen Sinusoiden essentiell für den nekrotischen Gewebeuntergang der Leber ist (Arai et al., 1993; Ando et al., 1994). Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass sowohl die Anwesenheit aktivierter Kupfferzellen, Leukozyten und Plättchen, als auch deren Interaktion miteinander zur vollständigen Aktivierung des Entzündungsprozesses notwendig sind. Im Gegensatz zu diesem Antigen-vermittelten unspezifischen Entzündungsprozess konnte für die Antigen-spezifische, von zytotoxischen T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort der Leber gezeigt werden, dass die hepatozelluläre Apoptose die Konsequenz der Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten und weniger die der Kupfferzellen ist (Ando et al., 1994).

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass es zu einer Kolokalisation von apoptotischen Hepatozyten mit Leukozyten, nicht aber mit Plättchen kommt (Eipel et al., 1994). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Endotoxinämie in einer Zunahme der Kolokalisation aktivierter Kupfferzellen mit apoptotischen Hepatozyten, aber nicht mit stagnierenden Leukozyten resultiert. Dies lässt den Schluß zu, dass für die Vermittlung der hepatozellulären Apoptose durch aktivierte Leukozyten kein direkter Zell-Zell-Kontakt mit Kupfferzellen erforderlich ist. Die Bedeutung der Kupfferzellen wird auch daraus ersichtlich, dass es unter Anwesenheit von Kupfferzellen durch LPS-Stimulation zur hepatozellulären Apoptose kommt. Eine Inaktivierung von Kupfferzellen durch Gadoliniumchlorid verhinderte dagegen neben der Aktivierung von Caspase-3 auch die hepatozelluläre Apoptose (Hamada et al., 1999). Arii und Imamura zeigten im Modell der kalten Konservierung und Reperfusion der Leber eine Abnahme der Leukozyten-Akkumulation auf annähernd das Niveau der Kontrollgruppe. Dies wurde nicht nur nach Vorbehandlung

mit einem anti-ICAM-Antikörper, sondern auch nach Inhibierung der Kupfferzellen mittels Gadoliniumchlorid beobachtet. Hieraus wird die Bedeutung der Kupfferzellen für die Initialisierung und Begünstigung des endotoxämischen Leberschadens ersichtlich (Arii und Imamura, 2000).

In der vorliegenden Arbeit führt die systemische Endotoxinämie nach 6 und 16 Stunden zu einer deutlichen Zunahme der direkten Nachbarschaft von apoptotischen Hepatozyten mit aktivierten Kupfferzellen auf mehr als 8% beziehungsweise 5%. Im Gegensatz hierzu fanden sich nur ca. 1 % aller stimulierten Kupfferzellen in direktem Kontakt mit apoptotischen Leberzellen. Es ist daher anzunehmen, dass durch den apoptotischen Zelltod die in Nachbarschaft gelegenen Makrophagen zur Phagozytose der Apoptosekörperchen angeregt werden.

7 Zusammenfassung

Das multiple Organversagen nach Endotoxinämie/Sepsis steht mit seiner hohen Mortalität im Zentrum des Intresses von Forschungsprojekten, die sich mit der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Intensivpatienten beschäftigen.

Gegenstand dieser Arbeit war die quantitative in vivo Analyse der hepatischen Mikrozirkulation der Ratte unter besonderer Berücksichtigung der nutritiven Perfusion, der Aktivierung und Zell-Zell-Interaktion von Leukozyten, Endothelien, apoptotischen Hepatozyten und Kupfferzellen nach Endotoxinämie.

Zur Analyse der mikrovaskulären und zellulären Antwort der Leber bei Endotoxinämie erfolgte die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation 6 Stunden und 16 Stunden nach einmaliger intraperitonealer bzw. intravenöser LPS-Applikation.

Als Untersuchungstechnik zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie verwendet, welche die direkte Visualisierung individueller Segmente der hepatischen Mikrozirkulation erlaubte. So war eine detaillierte quantitative Erfassung dynamischer Prozesse wie der sinusoidalen Perfusion, der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, der Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen, der Anzahl apoptotischer Hepatozyten sowie der Kolokalisation von Kupfferzellen, Leukozyten und apoptotischen Hepatozyten möglich. Zur Festigung dieser Daten erfolgte die histochemische Färbung apoptotischer Hepatozyten und Kupfferzellen mittels ApopTag/TUNEL Analyse und ED1 Makrophagenmarker mit nachfolgender Auswertung der Schnittpräparate.

Der Endotoxin-induzierte Gewebeschaden der Leber ist durch das sinusoidale Perfusionsversagen, die Beeinträchtigung der Gewebeoxygenierung sowie die Aktivierung von Leukozyten und die Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität mit nachfolgendem parenchymatösen und nicht-parenchymatösen Zellschaden

gekennzeichnet. Das sinusoidale Perfusionsversagen führt aufgrund einer Hypoxie zum Gewebeschaden. Die primäre Aktivierung und Akkumulation von Leukozyten geht dem späteren Leberschaden voraus und besitzt möglicherweise eine Triggerfunktion in der Vermittlung der Hepatotoxizität durch Endotoxin. Die Zunahme der Kommunikation/Interaktion von Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel, als Ausdruck der inflammatorischen Antwort, führt zu einer endothelialen Desintegration, einem progredienten Perfusionsausfall und folgend zur Parenchymzellschädigung. Von großer Bedeutung in der Vermittlung des Leberschadens nach Endotoxingabe ist die Aktivierung von Kupfferzellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Endotoxinämie in einer Zunahme der Kolokalisation aktivierter Kupfferzellen mit apoptotischen Hepatozyten, aber nicht mit stagnierenden Leukozyten resultiert. Dies lässt den Schluss zu, dass für die Vermittlung der hepatozellulären Apoptose durch aktivierte Leukozyten kein direkter Zell-Zell-Kontakt mit Kupfferzellen erforderlich ist.

In weiterführenden Untersuchungen bleibt zu klären, in welchem Maße die Freisetzung von Mediatoren durch Kupfferzellen an der Vermittlung des apoptotischen Zelltodes beteiligt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Einblick in die zellulären und mikrovaskulären Veränderungen der Leber während des septischen Geschehens und leisten somit einen Beitrag zum Verständnis dieses Krankheitsbildes.

8 Perspektive

Die durch Endotoxinämie ausgelöste Vielfalt zellulärer und humoraler Antworten mit der Konsequenz einer Organschädigung lässt sich nur bedingt durch kausal-therapeutische Maßnahmen, welche frühzeitig in die komplexen Reaktionskaskaden eingreifen, verhindern. Neben der Standardtherapie (Herdsanierung, Antibiotika) und den konventionell adjuvanten Behandlungskonzepten (Wiederherstellung, Stabilisierung der Vitalfunktionen) (Berger und Beger, 1991) wurden auch Strategien entwickelt, die auf der Blockierung der Triggerfunktionen von Endotoxin und dessen Aktivierung verschiedenster Mediatorkaskaden basieren (Berger und Beger, 1991; Bone, 1991; Held und Trautman, 1991; Giroir, 1993; Neugebauer et al., 1995).

Der Neutralisierung von TNF-α, dem aus Kupfferzellen freigesetzten zentralen Mediator der Sepsis (Ziegler et al., 1982; Lachmann et al., 1984), wird in der Therapie der Endotoxinämie/Sepsis große Bedeutung zugeschrieben. Es wurde gezeigt, dass die systemische TNF-alpha Antikörper-Gabe die Situation septischer Patienten nicht wesentlich verbessert, jedoch der Einsatz spezifischer Absorptionstechniken (Bsp. Microspheres-Based Detoxification System) das septische Geschehen positiv beeinflussen kann. Mit Hilfe von polyklonalen oder monoklonalen anti-TNF-alpha Antikörpern beschichteter Beads konnte TNF-alpha spezifisch reduziert werden, mit der nachfolgenden pathophysiologischen Konsequenz der signifikanten Reduktion der Monozytenadhäsion (Schwarzer-Pfeiffer et al., 2006). Ein ähnlicher Effekt kann durch den Einsatz von anti-TNF-alpha wirksamer Medikamente wie Etanercept, Infliximab und Adalimumab erzielt werden (Sharma und Sharma, 2007).

Anti-TNF-alpha Strategien sind nur mit partiellem Erfolg belegt, weshalb eine bessere Charakterisierung der Patienten und die gleichzeitige Beeinflussung anderer die Sepsis beeinflussender Mediatoren den therapeutischen Nutzen steigern kann (Reinhart und Karzai, 2001).

Kaneider et al. beschrieb 2005 einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Sepsis, in dem zellwandpenetrierende Lipopeptide, so genannte Pepducine, die sowohl an individuelle als auch multiple Chemokin-Rezeptoren binden, eingesetzt wurden (Kaneider et al., 2005).

Von Márquez-Velasco et al. konnte gezeigt werden, dass prophylaktisch oral verabreichtes LPS den Verlauf einer Sepsis bei CLP positiv beeinflusst. Als zugrundeliegender Mechanismus wird die Modulation der proinflammatorischen Antwort und die Erhöhung der Produktion von IgM und anti-LPS Antikörpern angenommen (Márquez-Velasco et al., 2007).
Die Blockade von Endotoxin war weitestgehend mit negativem Erfolg belegt, so dass nun die spezifische Unterbrechung der ausgelösten Signalkaskade von Interesse ist (Opal, 2007).

Von klinischer Bedeutung ist rekombinantes humanes aktiviertes Protein C (rhAPC), welches unter anderem durch die Bindung an den endothelialen Protein C Rezeptor eine Reduktion der inflammatorischen Antwort von Endothelzellen (Riewald et al., 2003) und der endothelialen Leukozytenadhäsion bewirkt (Joyce et al., 2001, Nick et al., 2004). rhAPC ist ein Induktor für die Expression vielfältiger anti-apoptotisch wirkender Gene (Joyce et al., 2001). Die Gabe von rhAPC zusätzlich zur Standardtherapie kann eingeschränkt empfohlen werden (Dellinger et al., 2004).

Von Meisel et al. konnte gezeigt werden, dass durch den Biomarker-kontrollierten Einsatz von GM-CSF die Immunkompetenz von Monozyten verbessert wird (Meisel et al., 2009).

Wie die bereits gewonnenen Erkenntnisse zeigen, sind noch weitere Studien erforderlich, um das Verständnis der komplexen Mechanismen und zellulären Wechselwirkungen im Rahmen der Endotoxinämie/Sepsis zu verbessern. Auch nach dieser Studie bleibt zu klären, ob und in welchem Maße die Freisetzung einer Kaskade von Todessignalen durch Kupfferzellen, anders als im direkten Zell-Zell-Kontakt, an der Vermittlung des apoptotischen Zelltodes beteiligt ist. Zusammenfassend soll die vorliegende Studie zur Erweiterung des Verständnisses der zellulären Kommunikation im Prozess der LPS-induzierten hepatozellulären Apoptose beitragen. In Hinsicht auf die große Bedeutung der zellulären Apoptose kann ein besseres Verständnis dieser Zell-Zell-Interaktionen zur Entwicklung neuer Therapiestrategien mittels einer Regulation des apoptotischen Zelltodes beitragen. Mögliche Therapiestrategien können sowohl an der „intrinsischen“ als auch an der „extrinsischen“ Signalkaskade der Vermittlung des apoptotischen Zelltodes ansetzen. Mögliche Ziele sind die Caspase-Kaskade (Caspase Inhibition / Protease Inhibition), die Regulation anti- bzw. proapoptotischer Proteine (z.B. Bcl-2-Familie), die

Beeinflussung der Todesrezeptoren Fas-FasL (mittels Fas receptor fusion protein) und die Applikation von siRNA gegen zahlreiche pro-apoptotische Faktoren (Wesch-Soldato et al., 2007).

9 Literaturverzeichnis

Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. Annu Rev Immunol 1984; 2:283.

Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrom. Blood 2003; 101:3765-3777.

Ando K, Guidotti LG, Wirth S et al. Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. J Immunol 1994; 152:3245-3253.

Andonegui G, Trevani AS, Lopez DH, Raiden S, Giordano M, Geffner JR. Inhibition of human neutrophile apoptosis by platelets. J Immunol 1997; 158:3372-3377.

Arai M, Mochida S, Ohno A, Ogata I, Fujiwara K. Sinusoidal endothelial cell damage by activated macrophages in rat liver necrosis. Gastroenterology 1993; 104:1466-1471.

Arii S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2000; 7:40-48.

Arredondo MI, Kampschmidt RF. Effect of endotoxins on phagocytic activity of the reticuloendothelial systems of the rat. Proc Soc Exp Biol Med 1963; 112:78-81.

Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. Lase-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. Am J Physiol 1988; 254:471-476.

Attanasio A, Schiffer D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. J Pathol 1995; 176:27-35.

Baatz H, Steinbauer M, Harris Ag, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of Rhodamin6G. Int J Microcirc Clin Exp 1995; 15:85-91.

Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. J Trauma 1988; 28:869-906.

Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie T, Kasper DL, Gorbach SL. Lessons learnd from an animal model of intra-abdominal sepsis. Arch Surg 1978; 113:853-857.

Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidale and extrasinusoidal sites of action. Am J Physiol 1994b; 267:G143-G149.

Baumann H, Gauldie J, The acute phase response. Immunol Today 1994; 15:74-80.

Bautista A, Meszaros K, Bojta J, Spitzer JJ. Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. J Leukoc Biol 1990; 48:123-128.

Berger D, Beger HD. Neue Aspekte zur Pathogenese und Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks. Chirurg 1991; 62:783-788.

Bloch EH. The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination. Angiology 1955; 6:340-349.

Boer U, Fennekohl A, Puschel GP. Sensitization by interleukin-6 of rat hepatocytes to tumor necrosis factor α-induced apoptosis. J Hepatol 2003; 38:728-735.

Bohrer SL, Rogers EL, Koehler RC, Traystman RJ. Effect of hypovolemic hypotension and laparotomy on splanchnic and hepatic arterial blood flow in dogs. Curr Surg 1981; 38:325-328.

Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood 197; 89:2429-2442.

Bone RC. A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. JAMA 1991; 266:1686-1691.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definition for sepsis and organ failure and guidelines fot the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992; 20:864-874.

Booke M, Hinder F, McGuire R, Traber LD, Traber DL. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase: effects on hemodynamics and regional blood flow in healthy and septic sheep. Crit Care Med 1999; 27:162-167.

Border JR, Hassett J, La Duca J, Seibel R, Steinberg S, Mills B, Losi P, Border D. The gut origin septic states in blunt multiple trauma (ISS=40) in the ICU. Ann Surg 1987; 206:427-448.

Bosscha K, Nieuwenhuijs VB, Gooszen AW, Dujvenbode-Beumer H, Visser MR, Verweij WR, Akkermans LMA. A standardized and reproducible model of intra-abdominal infection and abscess formation in rats. Eur J Surg 2000; 166:963-967.

Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heals S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Lancet 2002; 360:219-223.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. JAMA 1995; 274:968-974.

Brunkhorst M, Reinhart K. Häufigkeit der Sepsis in deutschen Intensivstationen und Leitlinien der DSG. Notfall- und Intensivmedizin 01/2006, S.34-35, GIT Verlag GmbH & Co. KG, Darmstadt

Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and anti-inflammatory stimuli. J Leukoc Biol 2000; 67:97-103.

Burkhadt M, Vollmar B, Menger MD. In vivo analysis of hepatic NADH fluorescence. Methodological approache to exclude Ito-cell vitamin A-derived autofluorescence. Adv Exp Med Biol 1998; 454:83-89.

Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Biochemistry of cell death by apoptosis. Biochem. Cell Biol 1990; 68:1071-1074.

Buwalda M, Ince C. Opening the microcirculation: can vasodilatators be useful in sepsis? Intensive Care Med 2002; 28:1208-1217.

Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. Hepatology 2003; 38:1188-1198.

Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. Science 1962; 137:499-508.

Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, Beere HM, Heer S, Whetton AD, Hickman JA, Dive C. Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemia cells. Cytometry 1995; 20:245-256.

Casale TB, Carolan EJ. Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. Inflamm Res 1990; 48:22-27.

Cerra FB, Siegel JH, Border JR, Wiles J, McMenamy RR. The hepatic failure of sepsis: Cellular vs. substrate. Surgery 1979; 86:409-421.

Chaundry IH, Hirasawa H, Baue AE. Impairment of reticuloendothelial system function with sepsis and its improvement with ATP-MgCl2 plus glucose administration. Adv Shock Res 1979; 2:153-162.

Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE. Hepatic microcirculatory failure following ischemia and reperfusion: Improvement with ATP-$MgCl_2$. Am J Physiol 1985; 248:804-811.

Clemens MG, Zhang JX. Regulation of sinusoidal perfusion: in vivo methodology and control by endothelins. Semin Liver Dis 1999; 19:383-396.

Cohen J, Glauser MP. Septic shock: treatment. Lancet 1991; 338:736-739.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; 420:885-891.

Crafa F, Gugenheim J, Saint-Paul M-C, Cavanel C, Lapalus F, Ouzan D, Militerno G, Mouiel J. Protectiv effects of prostaglandine E on normothermic liver ischemia. Eur Surg Res 1991; 23:278-284.

Darzynkiewicz ZG, Juan X Li, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry 1997; 27:1-20.

Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assays of Cell Viability. Discrimination of cells dying in apoptosis. Methods 1994, Chapter 2, Section VII in Cell Biology: Flow Cytometry, 2nd edition, Darzynkiewicz, Z., Crissman, H.A. and Robinson, J.R., eds., Academic Press.

De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166:98-104.

Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. Shock 2005; 24:19-23.

Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lesson learned. Shock 1998; 9:1-11.

Deitch EA. Multiple organ failure: Pathophysiology and potential futuretherapy. AnnSurg 1992; 216:117-134.

Deitch EA, Berg R, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. Arch Surg 1987; 122:185-190.

Dellinger RP, Carlet JM, Mausr H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmermann JL, Vincent JL, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Crit Care Med 2004; 32:858-873.

Dentener MA, Bazil V, Von Asmuth EJ, Ceska M, Buurman WA. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. J Immunol 1993; 150:2885-2891.

Dhainaut J-F, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C . Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory process. Crit Care Med 2001; 29:42-47.

Dijkstra CD , Doepp EA , Joling P , Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. Immunology 1985; 54:589-599.

Dini L, Pagliara P, Carla EC. Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. Microsc Res Tech 2002; 57:530-540.

Doi F, Goya T, Torisu M. Potential role of hepatic macrophages in neutrophil-mediated liver injury in rats with sepsis. Hepatology 1993; 17:1086-1094.

Dominioni L, Diongi R, Zamello M, Chiaranda M, Diongi R, Aquarolo A, Ballabio A, Sguotti C. Effects of high dose IgG of survival of surgical patients with sepsis scores of 20 or greater. Arch Surg 1991; 126:236-240.

Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. Annu Rev Immunol 1996; 14:155-177.

Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS. Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. Hepatology 1991; 13:751-757.

Eipel C, Bordel M, 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; 286:769-776.

Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. Ann Surg 2005; 241:477-484.

Eiseman B, Beart R, Norton L. Multiple organ failure. Surg Gynecol Obstet 1977; 144:323-326.

El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-α-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. Hepatology 2004; 39:1553-1562.

Ellis CG, Bateman RM, Sharpe MD, Sibbald WJ, Gill R. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow and capillary O(2) extraction in sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282: 156-164.

Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD 163. Immunobiology 2005; 210:153-160.

Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: their significance. Blood Rev 1992; 6:83-91.

Ferguson D, McDonagh PF, Biewer J, Paidas CN, Clemens MG. Spatial relationship between leukocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia. Int J Microcirc Clin Exp 1993; 12:45-60.

Figueras-Aloy J, Gomez L, Rodriguez-Miguelez JM, Jordan Y, Salvia MD, Jimenez W, Carbonell-Estrany X. Plasma nitrite/nirate and endothelin-1 concentrations in neonatal sepsis. Acta Paediatr 2003; 92:582-587.

Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. Crit Care 2002; 6:491-499.

Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestine 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; 182:41-49.

Fox ES, Thomas P, Broitman SA. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. Infect Immun 1987; 55:2962-1966.

Freudenberg MA, Meier-Dieter U, Staehelin T, Galanos C. Analysis of LPS released from Salmonella abortus equi in human serum. Microb Pathog 1991; 10:93-104.

Fukuzuka K, Edwards CK III, Clare-Salzler M. Glycocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000; 278:1005-1018.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992; 119:493-501.

Geerdes HF, Ziegler D, Lode H, Hund M, Loehr A, Fangmann W, Wagner J. Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979-1989. Clin Infect Dis 1992; 15:991-1002.

Gelman SI. Disturbance in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. Arch Surg 1976; 111:881-883.

Gelman SI, Dillard E, Bradley EL Jr. Hepatic circulation during surgical stress and anesthesia with halothane, isoflurane, or fentanyl. Anesth Analg 1987; 66:936-943.

Giroir BP. Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. Crit Care Med 1993; 21:780-789.

Gocan NC, Scott JA, Tyml K. Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilatation in septic rat skeletal muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 278:1480-1489.

Green DM, Trial J, Birdsall HH. TNF-alpha released by comigrating monocytes promotes transendothelial migration of activated lymphocytes. J Immunol 1998; 161:2481-2489.

Gregory SH, Wing EJ. Neutrophil–Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. J Leukoc Biol 2002; 72:239-248.

Grisham MB, Everse J, Janssen HF. Endotoxemia and neutrophil infiltration in vivo. Am J Physiol 1988; 254:1017-1022.

Gross PL, Aird WC. The endothelial and thrombosis. Semin Thromb Hemost 2000; 26:463-478.

Gundersen Y, Corso CO, Leiderer R, Dorger M, Lilleaasen P, Aasen AO, Messmer K. The nitric oxide donor sodium nitroprusside protects against hepatic microcirculatory dysfunction in early endotoxaemia. Intensive Care Med 1998; 24:1257-1263.

Hacker G. The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res 2000; 301:5-17.

Hamada E, Nishida T, Uchiyama Y et al. Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin. J Hepatol 1999; 30:807-818.

Hansson L, Alwmark A, Christensen P, Jeppsson B, Holst E, Bengmark S. Standardized intra-abdominal abscess formation with generalized sepsis: pathophysiology in the rat. Eur Surg Res 1985; 17:155-159.

Hasselgren PO. Prevention and treatment of ischemia of the liver. Surg Gynecol Obstet 1987; 164:187-196.

Haslett C, Savill J. Why is apoptosis important to clinicians? BMJ 2001; 322:1499-1500.

Haziot A, Rong GW, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. J Immunol 1993; 151:1500-1507.

Held T, Trautman M. Der septische Schock: Pathophysiologie, therapeutische Ansätze, Perspektive. Z ärztl. Fortbildung 1991; 85:502-505.

Hinshaw LB, Emerson TE, Taylor FB, Chang ACK, Duerr M, Peer GT, Flournoy DJ, White GL, Kosanke SD, Murray CK, Xu R, Passey RB, Fournel MA. Lethal Staphylococcus aureus-induced shock in primates: Prevention of death with anti-TNF antibody. J Trauma 1992; 33:568-573.

Hirsch S, Gordon S. The use and limitation of monoclonal antibodies against mononuclear phagocytes. Immunobiology 1982; 161:298-307.

Hoedemakers R M, Morselt H W, Scherphof G L, Daemen T. Heterogeneity in secretory response of rat liver macrophages of different size. Liver 1995; 15:313-319.

Horobin RW, Rashid F. Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 1. Some general mechanistic proposals, making use of a simplistic Chines box model. Histochemistry 1990; 94:205-209.

Hotchkiss RS, Karl IE. The Phatophysiology an Treatment of Sepsis. N Engl J Med 2002; 348:138-150.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med 1999; 27:1230-1251.

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J Immunol 2001; 166:6952-6963.

Ihara I, Harada Y, Ihara S, Kawakami M. A new complement-dependent bactericidalfactor found in nonimmune mouse sera: specific binding to polysaccharide of Ra chemotype Salmonella. J Immunol. 1982; 128:1256-1260.

Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. Gastroenterology 1995; 109:189-197.

Ince C, Sinaasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. Crit Care Med 1999; 27:1369-1377.

Ishii Y, Matsuura A, Iwaki H, Takami T, Kikuchi K. Two closely related antigens expressed on granulocytes, macrophages and some reticular elements in rat lymphoid tissues: characterization by monoclonal antibodies. Immunology SI 1984; 51:477-487.

Jaeschke H, Fischer MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophile-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. J Immunol 1998; 160: 3480-3486.

Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicol Sci 2002; 65:166-176.

Jaeschke H, Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A. Reply to: Calvien PA, Rudiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. Hepatology 2001; 33:1555-1557.

Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reoerfusion injury. Gastroenterology 2003; 125:1246-1257.

Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. Am J Physiol 1997; 273:1169-1173.

Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophile-induced parenchymal cell injury. J Leukoc Biol 1997; 61:647-653.

Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, Piccigall E, Amati L, Lembo A, Kalis C, Gumenscheimer M. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. J Endotoxin Res 2002; 8:319-327.

Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression and profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. J Biol Chem 2001; 276:11199-11203.

Kajikawa S, Kaga N, Futamura Y, Kakinuma C, Shibutani Y. Lipoteichoic acid induces preterm delivery in mice. J Pharmacol Toxicol Methods 1998; 39:147-154.

Kaneider NC, Agarwal A, Leger AJ, Kuliopulos A. Reversing systemic inflammatory response syndrome with chemokine receptor pepducins. Nat Med 2005; 11:661-665.

Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. J Exp Med 1998; 188:305-315.

Keppler D, Hagmann W, Rapp S, Denzlinger C, Koch HK. The relation of leukotrienes to liver injury. Hepatology 1985; 5:883-891.

Kerner T. Durchblutung und Gewebeoxygenierung von Leber und Pankreas während Hypotension durch volatile Anästhetika. Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München, 1993.

Kerr JFR, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. Apoptosis: Molecular basis of Cell Death 1991, chapt. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.5-29.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26:239-257.

Kessler CM, Nussbaum E, Tuazon CU. Disseminated intravascular coagulation associated with Staphylococcus aureus septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation. J Ifect Dis 1991; 164:101-107.

Knisely MH. A method of illuminating living structure for microscopic study. Anat Rec 1936; 64:499-534.

Knisely MH. Microscopic observations of the circulatory conditions in living frog liver lobules. Anat Rec 1939; 73:269-270.

Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occure by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. Transplantation 1999; 67:1099-1105.

Kuroe K, Kurokawa T, Nishikimi M, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H. Effects of thromboxane A2 synthetase inhibitor on postischemic liver injury in rats. Eur Surg Res 1991; 23:20-26.

Lachmann E, Pitsoe SB, Gaffin SL. Anti-lipopolysaccharide immunotherapy in management of septic shock of obstetric and gynaecological origin. Lancet 1984; 1:981-983.

Lawson JA, Fischer MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H. Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury. Hepatology 1998; 28:761-767.

Leaf A. Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. Circulation 1973; 48:455-458.

Leist M, Gartner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis-factor induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. Am J Pathol 1995; 146:1220-1234.

Lemasters JJ. Necroapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. AM J Physiol 1999; 276:G1-6.

Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and than reoxygenated. Circulation 1997; 95:885-891.

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; 141:709-716.

Lillehei RC, Longerbe JK, Bloch JH. Physiology and therpy of bacteremic shock. Experimental and clinical observations. Am J Cardiol 1963, 12:599-613.

Lippert Herbert : Lehrbuch Anatomie: 4. Auflage. München: Urban & Schwarzenberg, 1996

Lundsgaard-Hansen P, Pappova E, Urbaschek B, Heitmann L, Leaderach A, Molnes N, Oroz M, Wirth U. Circulatory deteriorationas the determinant of energy metabolism in endotoxin shock. J Surge Res 1972; 13:282-288.

Longnecker DE, Seyde WC. Anesthetic regimes: Advantages and disadvantages. In Microcirculatory technology (Eds. Baker CH, Nastuk WL), 343-365, Academic Press, Orlando, 1986.

Lopez S, Parts N, Marco AJ. Expression of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 during experimental murine listeriosis. Am J Pathol 1999; 155:1391-1397.

Loppnow H, Brade L, Brade H, Rietschel ET, Kusumoto S, Shiba T, Flad HD. Induction of human interleukin 1 by bacterial and synthetic lipid A. Eur J Immunol 1986; 16:1263-1267.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis, an overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146:3-15.

Márquez-Velasco R, Massó F, Hernández-Pando R, Montaño LF, Springall R, Amezcua-Guerra LM, Bojalil R. LPS pretreatment by the oral route protects against sepsis induced by cecal ligation and puncture. Regulation of proinflammatory response and IgM anti-LPS antibody production as associated mechanisms. Inflamm Res 2007; 56:385-390.

Marshall JC, Christou NV, Horn R, Meakins JL. The microbiology by multiple organ failure. The proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. Arch Surg 1988; 123:309-314.

Mathiak G, Szewczyk D, Abdullah F, Ovadia P,Feuerstein G, Rabinovici R. An improved clinical relevant sepsis model in the conscious rat. Crit Care Med 2000; 28:1947-1952.

Matz Katinka. Effekte eines initial hämorrhagischen Schocks auf die Hämodynamik und den klinischen Verlauf einer nachfolgenden Pseudomonas aeruginosa Sepsis in einem porcinen “two-hit” model. http://www.diss.fu-berlin.de/2001/113/matz.pdf

Mavier P, Preaux AM, Guigui B, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D. In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism. Hepatology 1988; 8:254-258.

McCuskey RS. Microscopic studies for studying the microvasculature of internal organ, in Physical Techniques in Biology and Medicine Microvasular Technology (Eds. Baker CH, Nastuk WL). Academic Press, New York, 1986, 247-264.

McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arteriols and hepatic sphincters. Am J Anat 1966;119:455-477.

McCuskey RS, Urbaschek R, McCuskey PA, Urbaschek B. In vivo microscopic studies of the responses of the liver to endotoxin. Klin Wochenschr 1982; 60:749-751.

McCuskey RS, Urbaschek R, McCuskey PA, Urbaschek B. In vivo microscopic observations of the responses of Kupffer cells and the hepatic microcirculation to Mycobacterium bovis BCG alone and in combination with endotoxin. Infect Immun 1983; 42:362-367.

McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmermann GA. Cell-cell-interaction s: leukocyte-endothelial interactions. Curr Opin Hematol 2003; 10:150-158.

Meisel C, Schefold JC, Pschpwski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. GM-CSF to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression: A Double-blind Randomized Placebo-controlled Multicenter Trail. Am J Respir Crit Care Med 2009.

Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy-brige over from in vito to in vivo. Immunol Today 1993; 14:519-522.

Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. Eur Surg Res 1991; 23:158-169.

Meyer J, Lentz CW, Shothert JC Jr, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia. Crit Care Med 1994; 22:306-312.

Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O´Dwyer ST, Arthur K, Dinarello CA, Ceramij A, Wolff SM. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. Surgery 1988; 104:280-286.

Mochida S, Ohno A, Arai M, Tamatani T, Miyasaka M, Fujiwara K. Role of adhesion molecules in the development of massive hepatic necrosis in rats. Hepatology 1996; 23:320-328.

Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. Semin Hematol 1993; 30:171-192.

Moyer E, Cerra F, Chenier R, Peters D, Oswald G, Watson F, Yu L, McMenamy R, Border JR. Multiple systems organ failure: VI. Death predictors in the trauma-septic state - the most critical determinants. J Trauma 1981; 21:862-869.

Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Iimura T. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophiles through P-selectin (CD62). J Immunol 1993; 151:3267-3273.

Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. Microsc Res Tech 1997; 39:350-364.

Nakamura M, Shibazaki M, Nitta Y, Endo Y. Translocation of platelets into Disse spaces and their entry into hepatocytes in response to lipopolysaccharides, interleukin-1 and tumour necrosis factor: the role of Kupffer cells. J Hepatol 1998; 28:991-999.

Nathan CF. Secretory products of macrophages. J Clin Invest 1987; 79:319-326.

Neugebauer E, Dimmeler S, Troidl H. Mediatorsysteme und Sepsis. Chirurg 1995; 66:2-10.

Nichols RL, Smith JW, Balthazar ER. Peritonitis and intra-abdominal abscess: an exprimental experimental model for the evaluation of human disease. J Surg Res 1978; 25:129-134.

Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, Poch KR, Fouty BW, O'Brien J, et al. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. Blood 2004; 104:3878-3885.

Nishimura T, Yoshida Y, Watanaba F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y. Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. Hepatology 1986; 6:701-707.

Nolan JP, O'Connel CJ. Vasculare response in the isolated rat liver. I. Endotoxin, direct effects. J Exp Med 1965; 122:1063-1073.

Oberholzer K, Oberhoizer A, Clare-Salzeer M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. FASEB J 2001; 15:879-892.

Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Conolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. J Clin Invest 1988; 81:1162-1172.

Opal SM. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. Int J Med Microbiol 2007; 297:365-377.

Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. Nature 1992; 359:848-851.

Papathanassoglou ED, Moynihan JA, Ackerman MH. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. Crit Care Med 2000; 28:537-549.

Papova E, Urbaschek B, Heitmann L, Oroz M, Streit E, Lemeunier A, Lundsgaard-Hansen P. Energy-rich phosphates and glucose metabolism in early endotoxin shock. J Surg Res 1971; 11:506-512.

Parker GA, Picut CA. Liver immunobiology. Toxicol Pathol 2005; 33:52-62.

Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. N Engl J Med 1993; 328:1471-1477.

Papucci L, Formigli L, Schiavone N, Tani A, Donnini M, Lapucci A, Perna F, Pempestini A, Witort E, Morganti M, Nosi D, Orlandini GE, Zecchi Orlandini S, Cappacioli S. Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending an c-myc and bcl-2 expression. Cell Tissue Res 2004; 316:197-209.

Peck G, Andrades M, Lorenzi R, da Costa M, Petronilho F, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Ritter C. Serum-induced macrophage activation is related to the severity of septic schock. Inflamm Res 2009; 58:89-93.

Petrucco O, Rao PS, Cavanagh D. Endotoxin shock in the dog. Alterations in hemodynamic and hematologic parameters during bolus and infusion studies. Am J Obstet Gynecol 1972; 114:1060-1065.

Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. Red blood cell rheology in sepsis. Intensive Care Med 2003; 29:1052-1061.

Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology. Am J Pathol 1988; 133:426-433.

Pohlman TH, Stannes KA, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleuin 1, and tumor necrosis factor-a increases neutrophil adherence by a CDw 18-dependent mechanism. J Immunol 1986; 136:4548-4553.

Polk HC, Shields CL. Remote organe failure: a valid sign of occult intra-abdominal infection. Surgery 1977; 81:310-313.

Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW. Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 1998; 149:601-604.

Post S, Gonzalez AP, Palma P, Rentsch N, Stiehl A, Menger MD. Assessement of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat. Hepatology 1992; 16:803-809.

Postel J, Schloerb PR, Furtado P. Pathophysiologic alterations during bacterial infusions for the study of bacteremic shock. Surg Gynecol Obstet 1975; 141:683-692.

Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelialcells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:2744-2748.

Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. Annu Rev Biochem. 1990; 59:129-170.

Randolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, Davis LS, Norgard MV. Treponema pallidum and Borellia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. J Immunol 1995; 2866-2877.

Rappaport AM. Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. Bibl Anat 1977; (16PT2):116-120.

Rappaport AM. The microcirculatory hepatic unit. Microvasc Res 1973; 6:212-228.

Redan JA, Rush BF, McCullough JN, Machiedo GW, Murphy TF, Dikdan GS, Smith S. Organ distribution of radiolabeled enteric Escherichia Coli during and after hemorrhagic shock. Ann Surg 1990; 211:663-668.

Reinders ME, van Wagensveld BA, van Gulik TM et al. No attenuation of ischemic and reperfusion injury in Kupffer cell-depleted, cold-preserved rat livers. Transplantation 1997; 63:449-454.

Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. Crit Care Med 2001; 29:121-125.

Renault G, Muffat-Joly M, Polianski J, Hardy RI, Boutineau JL, Duvent JL, Pocidalo JJ. NADH in situ laser fluorimetry: effect of pentobarbital on continuously monitored myocardial redox state. Lasers Surg Med 1987; 7:339-346.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seidel U, Di Padova F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB 1994; 8:217-225.

Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Ruf W. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells. Journal of Endotoxin Research 2003; 9:317-321.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Ealy goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 2001; 345:1368-1377.

Robinson AP, White TM, Mason DW. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. Immunology 1986; 57:239-247.

Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states. N Engl J Med 1999; 340:1555-1564.

Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. J Invest Surg 2003; 16:149-159.

Rush BF, Sori AJ, Murphy TF, Smith S, Flanagan JJ, Machiedo GW. Endotoxinemia and bacteremia during hemorrhagic shock. The link between trauma and sepsis? Ann Surg 198; 207:549-554.

Saba T. Physiology and pathophysiology of the reticuloendothelial system. Arch Int Med 1970; 126:1031-1052.

Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistant microcirculatory alterations are associated with organ failure and death with patients in septic shock. Crit Care Med 2004; 32:1825-1831.

Sands K, Bates D, Lanken P et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. JAMA 1997; 278:234-240.

Sawyer RG, Adams RB, May AK, Rosenlof LK, Prutt TL, Wilmore DW, Dellinger EP, Vangoor H. Antitumor necrosis factor antibody reduces mortality in the presence of antibiotic-induced tumor necrosis factor release. Arch Surg 1993; 128;73-78.

Schaefer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxine-induced apoptotic and necrotic cell death. FASEB J 2003; 17:660-667.

Schumann RR, Rietschel ET, Loppnow H. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. Med Microbiol Immunol 1994; 183:279-297.

Schedel I, Dreikhausen U, Nentwig B, Höckenschneider M, Rauthman D, Balikcioglu S, Coldewey R, Deicher H. Treatmen of gram-negativ septic shock with an immunglobulin preparation: A prospective, randomized clinical trial. Crit Care Med 1991; 19:1004-1113.

Schönharting MM, Schade UF. The effect of Pentoxifyllin in septic shock- new pharmacologic aspect of an established drug. J Med 1989; 20:97-105.

Schuster HP, Müller-Werdan U. Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen in Sepsis und MODS, Springer Berlin Heidelberg (2005), ISBN 978-3-540-00004-4.

Schwanzer-Pfeiffer D, Mitteregger R, Rossmanith E, Falkenhagen D. Comparison of specific adsorbents for tumor necrosis factor-alpha and therapeutic anti-tumor necrosis factor-alpha antibodies: an in vitro sepsis model. Int J Artif Organs 2006; 29:1140-1147.

Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. Int Arch Allergy Immunol 1994; 105:327-332.

Sharma R, Sharma CL. TNF-alpha inhibitors: Current indications. Indian J Crit Care Med 2007; 11:139-148.

Siegel JH. The liver as modulator of host-defense response: Host-defense failure as a manifestation of hepatic decompensation. In: Shock, sepsis and organ failure. Proceedings of the second Wiggers-Bernard-Conference. Schlag G, Redl H, Siegel JH (eds.). Springer Berlin Heidelberg (1990), 149-202.

Sindram D, Porte RJ, Hoffmann MR, Bentley RC, Clavien PA. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. FASEB J 2001; 15:1230-1232.

Sleyster E C, Knook DL. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. Lab Invest 1982; 47:484-490.

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; 44:576-585.

Steinhoff G, Behrend M, Sorg C, Wonigeit K, Pichlmayr R. Sequential analysis of macrophage tissue differentiation and Kupffer cell exchange after human liver transplantation. In: Wisse E, Knook DL, eds. Cells of the Hepatic Sinusoid, Vol. 2. Rijswijk: Kupffer Cell Foundation, 1989, 406-409.

Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K. Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelial. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 and LFA-3. Am J Pathol 1993; 142:481-488.

Strange R, Friis RR, Bemis LT, Geske FJ. Programmed cell death during mammary gland involution. Chapt. 15 of Cell Death, Methods in Cell Biol 1995; 46:355-366.

Strassburg CP. Shock liver. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2003; 17:369-381.

Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch III JP, Larrick J, Kunkel SL. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. Biochem Biophys Res Comm 1988; 155:1230-1236.

Sulahian TH, Hogger P, Wahner AE. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. Cytokine 2000; 12:1312-1321.

Te Koppele JM, Thurman RG. Phagocytosis of Kupffer cells predominantes in pericentral regions of the liver lobule. Am J Physiol 1990; 259:814-821.

Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. Biochem Biophys Acta 1999; 1411:437-455.

Traeger Tobias. Cecal Ligation and Puncture (CLP) oder Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP). Eine komperative Studie zweier Tiermodelle für polymikrobielle Sepsis. Dissertation, München 2003.

Twomey JJ, Laughter A, Brown MF. A comparison of the regulatory effects of human monocytes, pulmonary alveolar macrophages (PAMs) and spleen macrophages upon lymphocyte responses. Clin Exp Immunol 1983; 52:449-454.

Uchikura K, Wada T, Hoshino S et al. Lipopolysaccharides induced increases in Fas ligand expression by Kupffer cells via mechanisms dependent on reactive oxygen species. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 287:620-626.

Unanue ER, Belier DI, Lu CY, Allen PM. Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism. Immunol 1984;132:1-5.

Unger LS, Reilly FD. Hepatic microvascular regulation mechanisms. VII. Effects of endoportally-infused endotoxin on microcirculation and mast cells in rats. Microcire Endothelium Lymphatics 1986; 3:109-129.

Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. Crit Care Med 2001; 29:36-41.

van Furth R. Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages. In: van Furth R, ed. Mononuclear Phagocytes. Biology of Monocytes and Macrophages. Kluwer: Dordrecht, 1992, 3-12.

Vijtiuk N, Kosuta D, Basic I, Valpotic I. In vivo modulating effects of bacterial peptidoglycans on PHA-induced responses of porcine PBL an splenocytes. Immunobiology 1993; 188:274-280.

Vincent JL, Bakker J, Marécaux G, Schandene L, Kahn RJ, Dupont E. Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients. Results of a pilot study. Chest 1992; 101:810-815.

Vincent JL, Yagushi A, Pradier O. Platelet function in sepsis. Crit Care Med 2002; 30:313-317.

Vines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmermann GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998; 91:3527-3561.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature 1997; 390:350-351.

Vollmar B, Bauer C, Menger MD. n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched diet does not protect from liver injury but attenuates mortality rate in a rat model of systemic endotoxemia. Crit Care Med 2002; 30:1091-1098.

Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD. High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for in vivo monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. Microvasc Res 1997; 54:164-173.

Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl L, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressure of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. Anesth Analg 1992; 75:421-430.

Vollmar B, Glasz A, Menger MD, Messmer K. Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. Zentralbl Chir 1993; 118:691-696.

Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Dressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. J Hepatol 1994; 20:301-304.

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 Physiol 1994; 145:1421-1431.

Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leucocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1994; 267:786-793.

Vollmar B, Ruttinger D, Wanner GA, Leiderer R, Menger MD. Modulation of kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. Shock 1996; 6:434-341.

Vollmar B, Senkel A, Menger MD. In vivo evidence that intracellular adhesion molecule-1 does not mediate endotoxin-induced hepatic leukocyte-endothelial cell interaction. J Hepatol 1995; 23:613-616.

von Adrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles of LECAM-1 and the leukocyte ß2 integrins in vivo. Proc Natl Acad Sci 1991; 88:7538-7542.

Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. Int Rev Cytol 1980; 66:303-353.

Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. Eur J Pharmacol 2000; 407:1-15.

Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. Inreased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. J Immunol 2000; 165:4537-4543.

Weinstein WM, Onderdonk AB, Bartlett JG, Gorbach SL. Experimental intraabdominal abscesses in rats: development of an experimental model. Infect Immun 1974; 10:1250-1255.

Weissmann G, Smolen JE, Korchak HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. N Engl J Med 1980; 303:27-34.

Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayal A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. Curr Drug Targets 2007; 8:493-500.

Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmermann GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. J Clin Invest 1996; 97:1525-1534.

Wheller AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. N Engl J Med 1999; 340:207-214.

Wichtermann KA, Baue AE, ChaudryIH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. J Surg Res 1980; 29:189-201.

Wortha HP, Adams J. Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. In Einführung in die medizinische Biometrie (Ed. Adams J.). Gustav Fischer, Jena, (1992), 18-19.

Wu F, Cepinskas G, Wilson JX, Tyml K. Nitric oxide attenuates but superoxide enhances iNOS expression in endotoxin- and IFNgamma-stimulated skeletal muscle endothelial cells. Microcirculation 2001; 8:415-425.

Yodice PC, Astiz ME, Kurian BM, Lin RY, Rackow EC. Neutrophil rheologic changes in septic shock. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:38-42.

Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzman B, Heidecke CD, Pfeffer K. Essential role of γ-interferon in survival in colon ascendens peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. Infect Immun 1998; 66:2300-2309.

Ziegler EJ, Fischer CJ, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NNH, Allen E, Berger HJ, Knatterud GL, LoBuglio AF, Smith CR, The HA-1A Sepsis Study Group. Treatment of Gram-negativ bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double blind, placebo-controled trial. N Engl J Med 1991; 324:429-436.

Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, Galuser MP, SadoffJC, Douglas JH, Braude AI. Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutan Escherichia coli. N Engl Med 1982; 307:1225-1230.

Thesen zur Dissertation

Bedeutung der Kupfferzellen für die Vermittlung des Leberschadens bei Sepsis

1. Trotz intensiver klinischer und experimenteller Anstrengungen, die der Sepsis zugrunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln, ist die Mortalität septischer Patienten unverändert hoch.

2. Die Leber gehört zu den entscheidenden Organen der Abwehrreaktion bei Sepsis. Daher ist das Leberversagen bei Patienten mit Sepsis wegen dem damit einhergehenden Verlust der Synthese-, Exkretions- und Entgiftungsfunktion von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf und die Prognose der Patienten.

3. Für das akute septische Leberversagen sind bisher keine kausalen Therapieverfahren etabliert. Daher ist die Analyse mit tiefergreifendem Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis entscheidend, um die Entwicklung sowohl kausaler als auch adjuvanter Therapiemöglichkeiten für das akute Leberversagen voranzutreiben.

4. Zur Induktion einer Sepsis mit resultierendem akuten Leberschaden wurde in diesem Forschungsvorhaben den Versuchstieren Lipopolysaccharid (LPS) injiziert. Es ist sowohl die Betrachtung des Endotoxin-vermittelten Leberschadens als auch die Erfassung interferierender lokaler und systemischer Effekte möglich. Daher ist dieses Modell ideal zur Untersuchung der Vorgänge in der Leber beim septischen Organversagen geeignet.

5. Die sinusoidale Perfusion und das Leukozytenfließverhalten in Sinusoiden und Venolen kann in vivo mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht werden. Weiterhin wurden nach Entnahme von Blut- und Gewebeproben histologische, immunhistochemische und plasmaanalytische Untersuchungen durchgeführt.

6. Zur Beurteilung des apoptotischen Zelltodes wurde histochemisch die TUNEL-Analyse an Leberschnitten durchgeführt. Die Injektion von LPS führt zu einer Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren.

7. Die immunhistochemische Untersuchung mittels ED1-Färbung zur Visualisierung von Makrophagen/Kupfferzellen zeigt nach LPS-Applikation eine deutliche Erhöhung der Anzahl ED1-positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe.

8. LPS-Exposition führt zu einer Erhöhung der Kolokalisation apoptotischer Hepatozyten mit aktivierten Kupfferzellen aber nicht mit stagnierenden Leukozyten.

9. Durch den apoptotischen Zelltod werden die in Nachbarschaft gelegenen Makrophagen zur Phagozytose der Apoptosekörperchen angeregt.

10. LPS-Exposition beeinflusst nicht die Kolokalisation von aktivierten Kupfferzellen und Leukozyten.

11. Für die Vermittlung der hepatozellulären Apoptose durch aktivierte Leukozyten ist kein direkter Zell-Zell-Kontakt mit Kupfferzellen erforderlich.

12. In weiterführenden Untersuchungen bleibt zu klären, in welchem Maße die Freisetzung von Mediatoren durch Kupfferzellen und Leukozyten an der Vermittlung des apoptotischen Zelltodes beteiligt ist.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Martin Hirschmann Rostock, Oktober 2010