

Aus dem
Institut für Experimentelle Chirurgie und Zentrale Versuchstierhaltung
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar



Der Effekt von Thrombopoetin in einem experimentellen Modell des akuten septischen Leberschadens

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
2011

vorgelegt von
Jost Graf von Hardenberg

urn:nbn:de:gbv:28-diss2012-0031-8

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Vollmar, Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. C.-D. Heidecke, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universität Greifswald

Datum der Einreichung: 20.06.2011

Datum der Verteidigung: 22.02.2012

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 ABSTRACT	3
3 EINLEITUNG	4
3.1 Akutes Leberversagen	4
3.1.1 Definition	4
3.1.2 Ätiologie	4
3.1.3 Pathophysiologie	5
3.1.3.1 <i>Mikrovaskuläre Inflammation</i>	6
3.1.3.2 <i>Mikrovaskuläre Dysfunktion</i>	8
3.1.3.3 <i>Mechanismen des Zelltodes</i>	9
3.1.4 Management auf der Intensivstation	10
3.1.4.1 <i>Diagnose</i>	10
3.1.4.2 <i>Therapie</i>	11
3.1.4.3 <i>Prognose</i>	13
3.2 Sepsis	14
3.2.1 Definition	14
3.2.2 Epidemiologie	15
3.2.3 Pathophysiologie	16
3.2.3.1 <i>Auslösung der inflammatorischen Antwort</i>	16
3.2.3.2 <i>Mediatoren der Inflammation</i>	17
3.2.3.3 <i>Koagulopathie</i>	18
3.2.3.4 <i>Endotheldysfunktion und Mikrozirkulationstörung</i>	18
3.2.3.5 <i>Zelltod und Organversagen</i>	19
3.2.4 Management auf der Intensivstation	20
3.2.4.1 <i>Diagnose</i>	20
3.2.4.2 <i>Therapie</i>	20

3.2.4.3	<i>Prognose</i>	20
3.3	Thrombopoetin	21
3.3.1	Hämatopoetische Wachstumsfaktoren	21
3.3.2	Historie	22
3.3.3	Struktur	22
3.3.4	Physiologie	23
3.3.5	Pleiotrope Effekte	24
4	ZIELE DER STUDIE	26
5	MATERIAL UND METHODEN	27
5.1	Versuchstiere	27
5.2	Modell	27
5.2.1	Prämedikation mit Thrombopoetin	27
5.2.2	Induktion des akuten Leberversagens	27
5.2.3	Anästhesie und chirurgische Präparation	28
5.2.4	Experimentelle Gruppen	29
5.3	Methoden	29
5.3.1	Mikrozirkulation der Leber	29
5.3.1.1	<i>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie - Grundlagen</i>	30
5.3.1.2	<i>Fluoreszenzfarbstoffe</i>	32
5.3.1.3	<i>Sinusoidale Perfusion</i>	33
5.3.1.4	<i>Mikrovaskuläre Leukozyten-Akkumulation</i>	34
5.3.1.5	<i>Hepatozelluläre Apoptose</i>	35
5.3.2	Probeentnahme und Analyse	35
5.3.2.1	<i>Blutentnahme</i>	35
5.3.2.2	<i>Gewebeproben</i>	36
5.3.3	Vollblut- und Serumanalytik	36
5.3.3.1	<i>Vollblutanalytik</i>	36
5.3.3.2	<i>Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Serum</i>	36
5.3.3.3	<i>Bioplex Protein-Array-System</i>	37
5.3.4	Histologie und Immunhistochemie	37
5.3.4.1	<i>Thrombopoetin-Rezeptor (c-mpl)</i>	37
5.3.4.2	<i>Cleaved Caspase-3</i>	38

5.3.5	Molekularbiologie	38
5.4	Zusammenfassung des experimentellen Protokolls	39
5.5	Statistik	40
6	ERGEBNISSE	41
6.1	Intravitalmikroskopie	41
6.1.1	Sinusoidale Perfusion	41
6.1.2	Leukozytenstase	42
6.1.3	Hepatozelluläre Apoptose	42
6.2	Blut- und Plasmaanalysen	43
6.2.1	Blutbild	43
6.2.2	Transaminasen	43
6.2.3	Proinflammatorische Zytokine	44
6.3	Histologie und Immunhistochemie	46
6.3.1	Thrombopoetin-Rezeptor	46
6.3.2	Cleaved Caspase-3	47
6.4	Western-Blot Protein-Analyse	47
6.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	48
7	DISKUSSION	50
7.1	Diskussion von Material und Methoden	50
7.1.1	Tierexperimentelles Modell des akuten Leberversagens	50
7.1.2	Untersuchungstechniken	53
7.2	Diskussion der Ergebnisse	58
7.2.1	Expression des Thrombopoetin-Rezeptors	59
7.2.2	Effekte von Thrombopoetin im akuten Leberversagen	61
7.2.2.1	<i>Systemische Parameter</i>	61
7.2.2.2	<i>Mikrozirkulation und Inflammation</i>	61
7.2.2.3	<i>Hepatozellulärer Zelltod</i>	65
7.3	Folgerungen und Perspektiven	69
8	LITERATURVERZEICHNIS	71
9	DANKSAGUNG	91
10	CURRICULUM VITAE	92
		VI

ANHANG	93
Thesen zur Dissertation	93
Eidesstattliche Erklärung	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	Alaninaminotransferase
ALV	Akutes Leberversagen
AST	Aspartataminotransferase
GalN/LPS	Galaktosamin/Lipopolysaccharid
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HKT	Hämatokrit
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
JAK	Januskinase
KZ	Kupfferzelle
MIF	Makrophagenmigration inhibierender Faktor
MOV	Multiorganversagen
NO	Stickstoffmonoxid
PLT	Platelet
PRR	Pattern recognition receptor
RBC	Red blood cell count
ROS	Reactive oxygen species
SEZ	Sinusoidale Endothelzelle
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TPO	Thrombopoetin
WBC	White blood cell count

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Zentrale Rolle der Kupfferzelle (KZ) während der Inflammation im Sinusoid	7
Abb. 2	Zell-Stress führt zu Nekrose, Apoptose und Aponekrose	9
Abb. 3	Auslösung der inflammatorischen Antwort durch das angeborene Immunsystem	17
Abb. 4	Vergleich der kodierenden Regionen von Thrombopoetin und Erythropoetin	23
Abb. 5	Arbeitsablauf der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und deren Auswertung	30
Abb. 6	Prinzip der Epi-Illumination	32
Abb. 7	(A) Intravitalmikroskopisch betrachteter Ausschnitt eines Leberazinus (B) Schematischer Aufbau der Leber	34
Abb. 8	(A) Mikrovaskuläre Leukozytenadhäsion nach Rhodamin-6G Injektion (B) Hepatozelluläre Apoptose nach intravenöser Bisbenzimid-Gabe	35
Abb. 9	Experimentelles Protokoll	39
Abb. 10	Quantitative Analysen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie	41
Abb. 11	Spektrophotometrische Analysen der leberspezifischen Enzyme	44
Abb. 12	Plasmaanalysen der proinflammatorischen Enzyme	45
Abb. 13	Quantitative immunhistochemische Analysen der TPO-Rezeptor-Expression	46
Abb. 14	Quantitative immunhistochemische Analysen der cleaved Caspase-3	47
Abb. 15	(A) Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-3 (B) Repräsentative Bilder der Western-Blot Analyse	48

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das akute Leberversagen (ALV) ist durch zirkulatorische und metabolische Veränderungen, eine Leberdysfunktion und einen hepatozellulären Gewebeschaden gekennzeichnet. Verschiedenen pleiotropen Substanzen konnten experimentell direkte leberprotektive Eigenschaften beim ALV nachgewiesen werden. Bis jetzt ist die Rolle des pleiotrop wirkenden Hormons Thrombopoetin (TPO), dem Hauptregulator der Megakaryopoese und der Thrombopoese, während eines hepatisch endotoxämisch gesetzten Schadens durch GalN/LPS nicht untersucht worden. Deshalb war es das Ziel dieser Studie, die Rolle von TPO beim ALV am Mausmodell anhand der hepatischen mikrovaskulären Perfusion (intravitale Fluoreszenzmikroskopie), der hepatischen Apoptose und Nekrose (Histologie und Immunhistochemie), der hepatozellulären Integrität (Serum-Aspartataminotransferase, -Alaninaminotransferase und -Glutamatdehydrogenase), der inflammatorischen Antwort (Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-6) und der Expression von c-mpl, dem Rezeptor von TPO, zu untersuchen. C57BL/6J Mäusen wurden 720 mg/kg KG Galaktosamin und 10 μ g/kg KG Lipopolysaccharid (E.coli) i.p. 6 Stunden vor der Intravitalmikroskopie appliziert. Dies führte zur hepatozellulären Expression von c-mpl, dem Rezeptor von TPO. Außerdem wurden eine signifikante hepatozelluläre Apoptose und Nekrose induziert, die mit einer intrahepatischen Rekrutierung von Leukozyten, einer mikrovaskulären Dysfunktion und einer vermehrten Freisetzung von Transaminasen assoziiert waren. 24 Stunden vor der Induktion des akuten Leberversagens wurde den Tieren entweder eine niedrige Dosis von rekombinantem Maus-TPO (12,5 μ g/kg KG), eine hohe Dosis von rekombinantem Maus-TPO (75 μ g/kg KG) oder physiologische Kochsalzlösung appliziert. Sham-operierte Tiere ohne Induktion eines ALV dienten als Sham-Kontrolle. Die Gabe von niedrig dosiertem TPO beeinflusste das Ausmaß der hepatozellulären Apoptose nicht, hingegen schwächte hoch dosiertes TPO die Aktivierung von Caspase-3 gering ab. Die Applikation der hohen TPO-Dosis kehrte den Inflammations-induzierten Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration um. Dies könnte ein Hinweis auf eine negative „Feedback“-Schleife von TPO bei der Ausschüttung von IL-6 sein. Trotz der Tatsache, dass der TPO-Rezeptor auf

Zielzellen der Leber exprimiert wird, konnte TPO in diesem Modell nur eine untergeordnete Rolle in der Steuerung der hepatischen Apoptose zugeschrieben werden. TPO besitzt im endotoxämischen Leberversagen keine hepatozellulär protektiven Eigenschaften. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur Wirkung des ähnlich strukturierten, hämatopoetischen Wachstumsfaktors Erythropoetin.

2 ABSTRACT

Acute hepatic failure (AHF) is characterized by circulatory and metabolic changes, liver dysfunction and tissue damage. Various pleiotropic substances have been suggested as candidates that directly reduce the severity of liver injury upon acute hepatic failure. However, the role of the pleiotropic agent thrombopoietin (TPO), the main regulator of megakaryopoiesis and thrombopoiesis, has so far not been studied in the context of hepatic stress through GalN/LPS in the liver parenchyma. Therefore the intention of this study was to assess changes of hepatic microvascular perfusion (intravital fluorescence microscopy) as related to hepatic apoptosis and necrosis (histology and immunohistochemistry), hepatocellular integrity (serum aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and glutamate dehydrogenase), and the organism's inflammatory response (tumor necrosis factor alpha and interleukin-6) in view of the hepatocellular expression of the receptor c-mpl (histology). C57BL/6J mice were subjected to 720 mg/kg bw galactosamine (GalN) and 10 µg/kg bw lipopolysaccharid (E.coli) i.p. 6 hours before intravital fluorescence microscopy. GalN/LPS led to hepatocellular expression of c-mpl, the receptor of TPO. Furthermore it induced significant hepatocellular apoptosis and necrosis, which were associated with intrahepatic leukocyte recruitment, microvascular dysfunction and enzyme release. 24 h before inducing AHF the animals received either a low dose of recombinant mouse TPO (12,5 µg/kg bw) or a high dose of recombinant mouse TPO (75 µg/kg bw). Animals with induced AHF served as controls. Sham-operated animals without induction of AHF served as sham controls. Low dose of TPO did not influence the amount of hepatocellular apoptosis, whereas high-dose TPO slightly diminished the activation of caspase 3. The application of high dose TPO reversed the stress-induced increase of plasma IL-6 levels, giving a hint to a negative feedback of TPO on IL-6 release. Despite the fact that the TPO-receptor exists on target liver cells, TPO plays only a minor role in mediating hepatocyte apoptosis and does not provide protection against hepatic injury. This observation stands in contrast to the characteristics of the similarly structured protein erythropoietin, a related hematopoietic growth factor.

3 EINLEITUNG

3.1 Akutes Leberversagen

3.1.1 Definition

Das akute Leberversagen (ALV) ist ein lebensbedrohliches, seltenes Syndrom, das durch den plötzlichen Verlust der Leberfunktion bei einem Patienten ohne vorherige Lebererkrankung in der Anamnese gekennzeichnet ist [1]. Es kann Symptome wie ein Hirnödem, eine hämodynamische Instabilität, eine Koagulopathie, tiefgreifende metabolische Störungen, eine spezielle Prädisposition für bakterielle und fungale Infektionen sowie das Multiorganversagen umfassen [2]. Da der Zeitraum zwischen dem erstmalig auftretenden Ikterus und einer Enzephalopathie ein wichtiger die Therapie und das Outcome bestimmender Faktor ist, wurde das ALV in den 1990er Jahren in hyperakut, akut und subakut unterteilt. Respektive sind die Zeiträume für das Auftreten der Enzephalopathie in (i) innerhalb von 7, (ii) 8 - 28 und (iii) mehr als 28 Tagen festgelegt worden [3].

3.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des ALV ist vielfältig (Tab. 1). Die weitaus häufigsten Gründe für ein ALV stellen Viren und Medikamente dar. Ein Großteil der Fälle (20 - 30 %) ist kryptogen [4]. Die Ätiologie des ALV variiert weltweit erheblich. Beispielsweise zeigen Daten aus Entwicklungsländern eine ganz andere Ursachenverteilung als Daten aus Europa und Nordamerika. In Entwicklungsländern machen virale Ursachen den Großteil aus, hingegen spielen im Vergleich zu Nordamerika und Großbritannien Acetaminophen(Paracetamol)-Intoxikationen dort keine Rolle [5, 6]. Zieht man eine große retrospektive Studie aus dem Ruhrgebiet im Zeitraum 2002 - 2008 heran, stellen Medikamente (39,6 %) und virale Hepatitiden (23,1 %) die zwei Hauptursachen dar. In etwa 1/5 der Fälle bleibt die Ursache kryptogen [7]. Wie die Daten der PROWESS-Studie (*Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis Study*) darlegen, trat bei einer Sepsis ein ALV mit einer Inzidenz von 2,8 % auf [8].

<p>Viral Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D (Ko/Superinfektion bei Hepatitis B), Hepatitis E, Non-A-non-B-non-C-Hepatitis, Zytomegalievirus, Ebstein-Barr-Virus, Herpes-simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus, humanes Herpesvirus 6, Parvovirus B19, Parainfluenzavirus, Adenovirus, Gelbfieber, Q-Fieber, hämorrhagisches Fieber (Dengue-Virus und Hantaan-Virus);</p>
<p>Idiosynkratisch Halogenierte Kohlenwasserstoffe (Halothan, Isofluran, Enfluran), Kumarine, Methyldopa, Phenytoin, Carbamazepin, Valproat, Rifampicin, Penicillin, Sulfonamide, Chinolone, Ketokonazol, Terbinafin, NSAR, hochaktive retrovirale Therapie, Glitazone, Thiouracil, Allopurinol, Amiodaron, Dihydralazin, MAO-Hemmer, trizyklische Antidepressiva, pflanzliche Arzneimittel (z.B. Kava-Kava);</p>
<p>Toxisch-dosisabhängig Acetaminophen, Isoniazid, Tetrazykline, Methotrexat, Tetrachlorkohlenstoff, industrielle Lösungsmittel, Amphetamine, Kokain, Amanita-Toxin (Knollenblätterpilz), Bacillus-cereus-Toxin;</p>
<p>Toxisch-synergistisch Ethanol + Acetaminophen, Barbiturate + Acetaminophen, Isoniazid + Rifampicin, Trimethoprim + Sulfamethoxazol, Amoxicillin + Clavulansäure;</p>
<p>Metabolisch M. Wilson, α-1-Antitrypsinmangel, hereditäre Galaktosämie, hereditäre Tyrosinämie, Fruktoseintoleranz, Reye-Syndrom, nichtalkoholische Steatohepatitis;</p>
<p>Schwangerschaftsinduziert Akute Schwangerschaftsfettleber, HELLP-Syndrom (hemolysis, elevated liver tests, low platelets);</p>
<p>Vaskulär Budd-Chiari-Syndrom, Lebervenenverschlusskrankheit, Schockleber, akute Leberstauung (akutes Rechtsherzversagen, Herzbeutelamponade), Sichelzellanämie;</p>
<p>Diverses Autoimmunhepatitis, maligne Infiltration (z.B. Lymphom, hepatozelluläres Karzinom, Metastasen), Hyperthermie, Sepsis, kryptogen.</p>

Tab. 1: Ätiologien des akuten Leberversagens (aus: [4]).

3.1.3 Pathophysiologie

Schlüsselrollen in der Pathophysiologie der Leberzellschädigung spielen ähnlich wie in der Sepsis die Inflammation und die mikrovaskuläre Dysfunktion. Wenn durch

diese Vorgänge die Reparationsmechanismen einer Zelle erschöpft sind, tritt der Zelltod ein. Massiver akuter Leberzelltod mündet in ein akutes Leberversagen. Das folgende Kapitel soll einen kurzen Überblick über die zugrunde liegenden Mechanismen und deren Zusammenspiel geben.

3.1.3.1 *Mikrovaskuläre Inflammation*

Aufgrund ihrer anatomischen Lage treten Hepatotoxine aus dem Gastrointestinaltrakt zuerst mit dem retikuloendothelialen System der Leber im Sinusoid in Kontakt (Abb. 1). Zu diesem gehören Kupfferzellen und sinusoidale Endothelzellen (SEZ). Es wird diskutiert, dass der eigentlich schützende Effekt der Kupfferzellen im Sinusoid durch eine Überstimulation in einen schädigenden Effekt münden kann [9]. Kupfferzellen phagozytieren, präsentieren Antigene und synthetisieren Mediatoren [10]. Zu letzteren zählen auch inflammatorische Mediatoren wie z. B. der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) [11] und reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) [12]. ROS zerstören Zellen entweder direkt durch Lipidperoxidation oder indirekt durch das Auslösen von Signalwegen, die redoxsensitive Enzyme, Organellen (z. B. Mitochondrien) und Transkriptionsfaktoren beeinflussen [13, 14]. Die TNF- α -Serumspiegel korrelieren mit der Leberschädigung [15]. Dies deutet darauf hin, dass die Kupfferzellen über die Synthese von TNF- α zur Leberzellschädigung beitragen.

Durch die Mediatorfreisetzung der Kupfferzellen werden Leukozyten aktiviert und akkumulieren in den hepatischen Gefäßen. Die aktivierten Leukozyten werden in den Sinusoiden durch ihre veränderte Formbarkeit, die Zellschwellung der Endothelzellen und die Dysbalance der den Gefäßdurchmesser der Sinusoide bestimmenden Faktoren in ihrer Mobilität stark eingeschränkt. Das „Priming“ der akkumulierenden Leukozyten mündet in eine zunehmende ROS-Freisetzung und hepatozelluläre Schädigung [16].

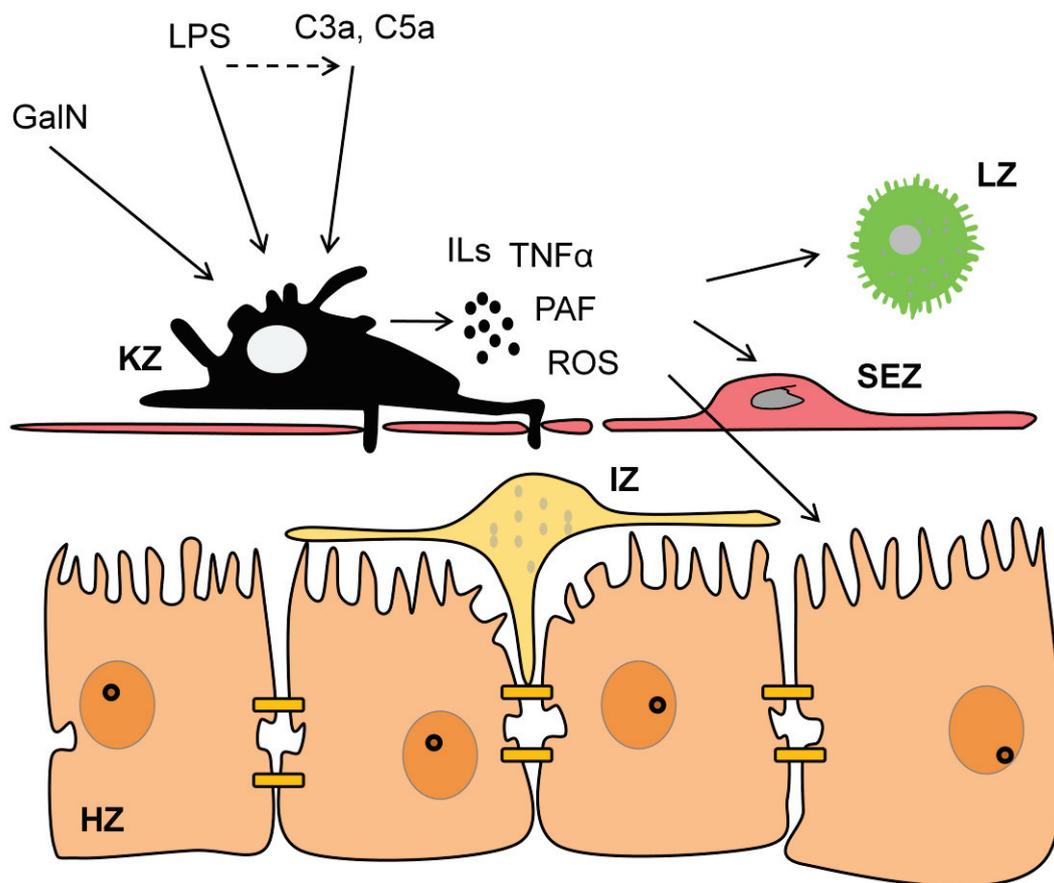


Abb. 1: Zentrale Rolle der Kupferzelle (KZ) während der Inflammation im Sinusoid, hier beispielhaft durch die Hepatotoxine Galaktosamin (GalN) und Lipopolysaccharid (LPS) dargestellt. Diese aktivieren die KZ direkt oder wie LPS auch über das Komplementsystem (C3a, C5a). Neben Phagozytose und Antigenpräsentation synthetisierten die KZ inflammatorische Mediatoren wie Interleukine (ILs), TNF- α , den Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) und ROS. Diese schädigen entweder direkt oder aktivieren über die Induktion von Signalwegen Leukozyten (LZ), Sinusendothelzellen (SEZ) und Hepatozyten (HZ). Itozellen (IZ) (modifiziert nach [16]).

Parallel findet eine Leukozytenmigration in das subendotheliale Gewebe und in das Interstitium statt, welche durch verschiedene Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Faktoren wie z. B. CXCL12 gesteuert wird [17]. Diese Faktoren spielen möglicherweise eine Schlüsselrolle in der fortschreitenden Leberschädigung durch Leukozyten [18]. Daneben produzieren Leukozyten selbst hydrolytische Enzyme [19], die u. a. isoliert Hepatozyten schädigen [20]. Im GalN/LPS-Modell korreliert die Leukozytenmigration mit dem apoptotischen Zelltod von Hepatozyten [21].

Eine weitere Rolle in der inflammatorischen Leberschädigung spielen Thrombozyten [22]. Sie synthetisieren proinflammatorische und gerinnungsfördernde Mediatoren, weshalb vermutet wird, dass sie den Endothelschaden fördern und weitere Leukozyten rekrutieren [16].

3.1.3.2 Mikrovaskuläre Dysfunktion

Die SEZ sind sekretorische Zellen und besitzen durch ihre Mediatoren sowohl immunoregulatorische wie auch proinflammatorische Wirkungen [23, 24]. Obwohl ihr Endothel gefenstert ist, bilden sie eine funktionelle Barriere zwischen Blutstrom und Hepatozyten. Ihre Integrität ist entscheidend für die Leberfunktion und die Balance der Oxidantien [25]. Die Inflammation führt zur Expression von *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) auf SEZ [26], wodurch der bereits oben beschriebenen, schädlichen Leukozytenadhäsion und -transmigration der Weg geebnet wird. Durch die Schädigung entstandene Spalten im Endothel führen zum Kontakt zwischen Leukozyten und Hepatozyten [27]. Außerdem sorgen aktivierte SEZ für einen prokoagulatorischen Zustand. Damit tragen sie substantiell zum Leberschaden bei [16].

Ein weiterer Grund für die mikrovaskuläre Dysfunktion ist eine verstärkte unkoordinierte Freisetzung von vasokonstriktiven Substanzen. Die daraus folgende Dysbalance des hepatischen Blutflusses verstärkt durch eine Störung der Mikrozirkulation ebenfalls die Leberschädigung [28]. Eine Schlüsselrolle spielt dabei wahrscheinlich das Endothelin-1/Endothelin-1-Rezeptor-(ET-1/ET-1-R)-System wobei ROS, Endotoxine, Hypoxie und Scherkräfte deren Genexpression induzieren [29]. ET-1 besitzt vasoaktive Eigenschaften. Über eine verstärkte Stickstoffmonoxid-(NO)-Produktion wird beim Ischämie/Reperfusionsschaden dieser vasoaktive Effekt von ET-1 ausgeglichen [30]. Eine Dysbalance dieser beiden Substanzen scheint für die mikrovaskuläre Dysfunktion mitverantwortlich zu sein [16].

3.1.3.3 Mechanismen des Zelltodes

Durch die Inflammation und mikrovaskuläre Dysfunktion kommt es neben der Leberzellschädigung auch zum Leberzelluntergang. Beschrieben werden in diesem Zusammenhang zwei unterschiedliche Vorgänge: die Apoptose und die Nekrose [16]. Die Apoptose ist der Zelltod, der über Signalwege zu einem kontrollierten Zelluntergang unter hohem ATP-Verbrauch führt. Bei der Nekrose führt eine Erschöpfung der ATP-Reserven letztendlich zu einer Plasmamembranruptur mit Entleerung des Zellinhalts ins Interstitium [31]. Als entscheidend für die Art des Zelltodes sind wahrscheinlich die ATP-Verfügbarkeit und die Art des schädigenden Insults zu sehen [32].

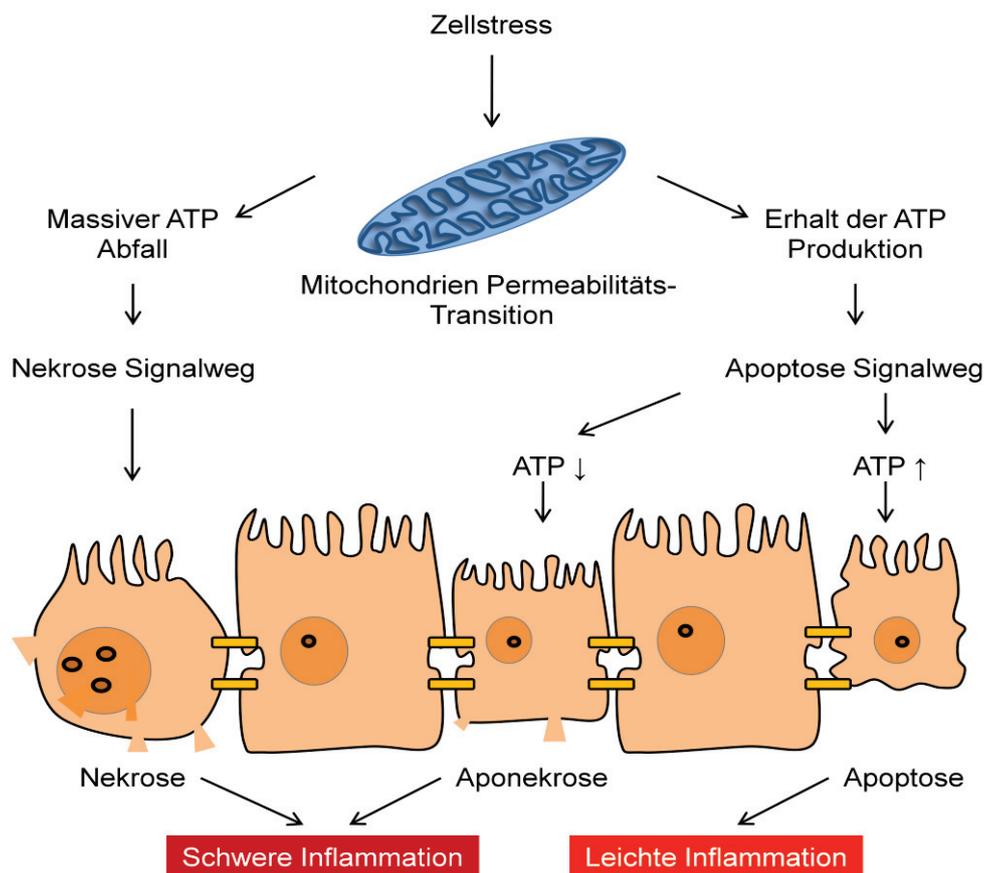


Abb. 2: Zell-Stress führt zu Nekrose, Apoptose und Aponekrose. Auf eine schwere Mitochondrien-Permeabilitäts-Transition (MPT) folgt die Mitochondrien-Schwellung und -Lyse, den Signalen für eine Nekrose. Bei leichter MPT werden über Cytochrom-C-Freigabe Caspasen aktiviert, die die Apoptose einleiten. Steht für den Vorgang nicht mehr genug ATP zur Verfügung, wird die Aponekrose eingeleitet. Nekrose und Aponekrose bedingen eine schwere, die Apoptose eine leichte Inflammation (modifiziert nach [16]).

Beim durch GalN und LPS ausgelösten Leberschaden kommt es überwiegend zum apoptotischen Zelltod. GalN löst die Apoptose durch Aktivierung von Caspase-3 aus, die durch sekundäre Nekrose in das Plasma gelangt [33]. Die Aponekrose ist ein Vorgang, der durch Überlappung von Signalwegen der Apoptose und Nekrose entsteht. Dieser Begriff wird erst seit kurzem gebraucht [34].

Nekrotische Hepatozyten ziehen aktivierte Leukozyten durch chemotaktische Substanzen zu sich [16]. Diese verstärken durch die Freisetzung von ROS und Proteasen, wie oben beschrieben, den lokalen Gewebeschaden. Beschleunigt wird der Gewebeschaden wahrscheinlich durch die Freisetzung von *high mobility group box-1* (HMGB-1) aus den Hepatozyten, wodurch zytotoxische T-Zellen angelockt werden [35]. Ähnlich wie die nekrotischen Hepatozyten setzen auch apoptotische Hepatozyten Peptidmediatoren frei, die Entzündungszellen anlocken und die entzündungsabhängige Schädigung verstärken [16].

3.1.4 Management auf der Intensivstation

3.1.4.1 Diagnose

Um ein ALV zu diagnostizieren, müssen 1. eine akute Entwicklung einer schweren Leberfunktionsstörung mit Koagulopathie und Ikterus bestehen, 2. eine hepatische Enzephalopathie vorhanden und 3. eine vorbestehende Lebererkrankung ausgeschlossen sein [4].

Zum Nachweis der Leberfunktionsstörung stehen diverse Testmethoden, die kontrovers diskutiert werden, zur Verfügung. Man unterscheidet statische von dynamischen Testverfahren (Tab. 2). Statische biochemische Parameter sind schneller ermittelbar, haben in Studien allerdings gezeigt, dass sie oftmals mit zu geringer Sensitivität eine Leberfunktionsstörung erkennen lassen [36]. Dynamische Verfahren wie der Monoethylglyncinxyloidtest (MEGX-Test) und die Indozyaningrünverschwinderate (ICG-Clearance) sind den statischen Testverfahren in der Prognose überlegen [37-39].

Statische Tests	ALT, AST	Hepatozelluläre Integrität
	γ -GT, AP	Cholestase
	Bilirubin	Exkretionsleistung
	Gerinnungsfaktoren	Syntheseleistung
	Albumin	Syntheseleistung
Dynamische Tests	ICG-Clearance	Clearanceleistung
	MEGX-Test	Metabolisierungskapazität
	Aminosäuren-Clearance-Test	Syntheseleistung

Tab. 2: Einteilung der Leberfunktionstests. ALT (Alaninaminotransferase), AST (Aspartataminotransferase), γ -GT (γ -Glutamyltransferase), AP (alkalische Phosphatase), ICG (Indozyaningrün), MEGX (Monoethylglycinxilidid) (aus: [40]).

Die hepatische Enzephalopathie ist eine klinische Diagnose, die mit Hilfe der Westen/Haven-Kriterien gestellt wird [41]. Eine vorbestehende Lebererkrankung muss ausgeschlossen werden, weil sie andere Komplikationen entwickelt und dementsprechend ein anderes Monitoring benötigt, sowie bei vorliegender Leberzirrhose nicht die Möglichkeit einer Notfalllebertransplantation besteht [4]. Nach der Diagnose des ALV steht die Identifikation der Ursache des ALV im Vordergrund, da diese einen wichtigen prognostischen Faktor in der spontanen Überlebensrate darstellt. Diese Rate variiert je nach Ursache zwischen 10 - 90 % [6].

3.1.4.2 Therapie

Um dem Patienten bestmögliche Therapieoptionen bieten zu können, muss er rechtzeitig in ein Transplantationszentrum verlegt werden. Für die Entscheidung, wann dies erfolgen sollte, sind spezielle Überweisungskriterien für Acetaminophen- und nicht-Acetaminophen-ursächliche ALV entwickelt worden [42]. Bernal et al. schlagen für Transplantationszentren vier Prinzipien vor, nach denen der Patient behandelt werden sollte: 1. Identifizierung und Entfernung des ALV-auslösenden Agens, 2. Verbesserung des Zustandes für die hepatische Regeneration, 3. Vorausssehen und Prävention von Komplikationen und 4. frühe Identifizierung und Transplantation von Patienten ohne Chance auf eine Leberregeneration [43]. Zur Therapie des ALV zählen:

1. Die spezifische Behandlung

Eine spezifische Therapie ist nur in Fällen mit bestimmter Ätiologie möglich. Bei Acetaminophenintoxikation profitieren Patienten durch die intravenöse Gabe von N-Acetylcystein innerhalb der ersten 8 h nach Intoxikation [44]. Eine neue Studie schlägt auch N-Acetylcystein bei nicht-Acetaminophen bedingtem ALV in der frühen Phase vor [45]. Intoxikationen mit *Amanita phalloides* werden u. a. durch die spezifischen Antidote Penicillin G und Silibin behandelt [46]. Dem HELLP-Syndrom (*haemolysis, elevated liver enzyme levels, low platelet count*) kann nur durch die Beendigung der Schwangerschaft entgegengetreten werden [47]. Die frühe Gabe von Lamivudin besitzt das Potenzial, das ALV bei Patienten mit schwerer akuter Hepatitis B zu verhindern [48].

2. Die supportive Intensivtherapie

Die supportive Intensivtherapie umfasst kardiovaskuläre, renale und respiratorische Unterstützung, Ernährung, Infektionskontrolle, Temperaturkontrolle und das neurologische Management [43].

3. Die artifiziellen und bioartifiziellen Leberunterstützungssysteme

Das Ziel der Leberunterstützungssysteme ist es, mit der Entfernung von schädlichen Toxinen aus dem Blut der Leber Zeit zur vollständigen Heilung zu geben oder die Zeitspanne bis zur Lebertransplantation zu überbrücken. Die in den 1970er Jahren eingeführte Kohle-Hämoperfusion stellte sich als ineffektiv heraus [49]. Bioartifizielle Systeme stellen z. B. das HepatAssist (Arbios Systems, Inc., Los Angeles, USA), welches Schweine-Hepatozyten als zelluläre Komponente und Kohle enthält, sowie das *Extracorporeal Liver Assist Device* (Vital Therapies, Inc., La Jolla, USA), in denen menschliche hepatoblastoma-Zell-Linien zur Dialyse dienen, dar. Diese konnten bislang keine klinisch signifikanten Verbesserungen zeigen [50, 51].

Zur Albumindialyse entwickelte Geräte, wie das an der Universität Rostock entwickelte *Molecular Adsorbent Recirculating System* (MARS) und das System Prometheus zeigen eine signifikante Verbesserung der Leberfunktion [52-54]. Bis

jetzt fehlen allerdings große Kontrollstudien, da die Maschinen einem zu kleinen Patientenkollektiv zugänglich sind [2].

4. Die Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation bleibt die einzig definitive Therapie für Patienten, deren hepatozytäre Regenerationsfähigkeit erschöpft ist [55]. Wenn Patienten mit einem ALV die Kriterien erfüllen (Tab. 2), werden sie als *high urgent* in die Warteliste für Spenderorgane aufgenommen [56], es sei denn, es bestehen Kontraindikationen wie irreversible Hirnschäden, eine fulminante Sepsis, AIDS, ausgeprägte Komorbiditäten oder eine maligne Grunderkrankung [4]. Eine weitere Therapiemöglichkeit in der Zukunft könnte die *Auxiliary Liver Transplantation* sein. Hier wird zusätzlich zur geschädigten Leber ein Allograft implantiert, welches nach Erholung der nativen Leber wieder entnommen wird. Bislang fehlen hierzu jedoch große klinische Studien [57].

3.1.4.3 *Prognose*

Eine Prognoseabschätzung ist von entscheidender Bedeutung, um die Notwendigkeit und den Zeitpunkt der orthotopen Lebertransplantation festzulegen. Das Zusammenspiel von hepatischer Regenerationsfähigkeit (entscheidend sind hier das Patientenalter und die Ätiologie), des Ausmaßes der hepatozellulären Schädigung, der Schwere von Enzephalopathie und Hirnödem sowie das Fortschreiten des Multiorganversagens bestimmen den Ausgang des ALV [58, 59]. Diese Faktoren wurden in Prognose-Systeme eingearbeitet, unter denen die bedeutendsten die *King's College Criteria* (KCC), die *Clichy Criteria* (CC) und der *Mayo End Stage Liver Disease-Score* (MELD-Score) sind (Tab. 3). Deren Vor- und Nachteile werden in der Fachwelt seit Jahren kontrovers diskutiert [58, 60, 61].

Scores	hepatische Regeneration	hepatischer Schaden	Enzephalopathie	Multiorgan- versagen
<i>Clichy (Hep B)</i>	Alter < 30, > 30	Faktor V	Grad III / IV	
<i>King's College Acetaminophen 1 Acetaminophen 2</i>		INR > 3,5	Grad III / IV	pH < 7,3 Kreatinin > 300
<i>Kings's College nicht- Acetaminophen 1 nicht- Acetaminophen 2</i>	ungünstige Ätiologie (Medikamente, sero- negativ) Alter < 10, > 40	INR > 6,5 INR > 3,5 BR > 300 µmol	Akute / subakute Präsentation	
<i>MELD</i>		Bilirubin / INR		Kreatinin

Tab. 3: Prognostische Scores für das akute Leberversagen (aus: [58]).

Eine britische Studie untersuchte retrospektiv 1237 Patienten mit ALV in den Jahren 1992 - 2008. Von 327 zur Transplantation angemeldeten Patienten erhielten 263 (80,4 %) eine orthotope Lebertransplantation, deren derzeitiges Überleben bei einer mittleren Nachuntersuchungszeit von 57 Monaten 70 % beträgt. Von den 974 nicht transplantierten Patienten leben noch 693 Patienten (71 %). 281 Patienten starben ohne Lebertransplantation: 260 Patienten innerhalb der ersten 30 Tage nach Aufnahme in die Klinik [62].

Diese Daten belegen, dass das ALV trotz der Fortschritte in der Intensivmedizin ein schweres Krankheitsbild bleibt, dessen einzig kurativer Ansatz meist die Lebertransplantation mit ihren Risiken und Folgen ist.

3.2 Sepsis

3.2.1 Definition

Im Volksmund „Blutvergiftung“ genannt, ist die Sepsis jedoch weit mehr, nämlich eine lebensbedrohliche, komplexe intravasale Inflammation. Ein chemischer, physikalischer oder infektiöser Insult führt zu dieser systemischen Inflammation, welche den Wirt schädigt. Erstmals wurde 1914 durch den deutschen Arzt Hugo

Schottmüller definiert: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ [63]. Eine Konsensus-Konferenz veröffentlichte 1992 Definitionen, die zwischen Inflammation, Infektion und Organschaden unterscheiden [64]. Weltweit sind diese Definitionen anerkannt [65]:

1. Das *systematic inflammatory response syndrom* (SIRS) liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Infektionszeichen vorliegen: die Temperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$, eine Pulsfrequenz von > 90 Schlägen/min, eine Atemfrequenz von $> 20/\text{min}$, ein arterieller $\text{pCO}_2 < 32$ mmHg, die Leukozyten im Blut $> 12.000/\text{mm}^3$ oder < 4000 mm^3 oder ein Blutbild mit $> 10\%$ unreifen Neutrophilen.
2. Wenn ein SIRS durch eine Infektion hervorgerufen worden ist, spricht man von einer Sepsis.
3. Geht mit der Sepsis gleichzeitig eine Dysfunktion ein oder mehrerer Organe einher, ist der Zustand als schwere Sepsis definiert.
4. Ist im Zustand der schweren Sepsis eine Hypotension nicht durch Volumengabe ausgleichbar, spricht man vom septischen Schock.
5. Abnormale Organfunktion in mehr als einem lebenswichtigen Organ wird als Multiorganfunktionssyndrom (MODS) und der Ausfall von mehr als einem Organsystem als Multiorganversagen (MOV) definiert.

3.2.2 Epidemiologie

„Making Sepsis public“ - so titelte 2009 die Deutsche Sepsis Gesellschaft auf ihrem international besetzten Weimarer Sepsis Update. In den USA haben sich von 1993 bis 2003 nicht nur die Hospitalisationen mit der Diagnose *severe sepsis* nahezu verdoppelt. Auch die Anzahl der Organdysfunktionen in der schweren Sepsis hat zugenommen [66]. Angesichts der zunehmenden Inzidenz ist es wichtig, das Thema Sepsis mehr in den Fokus der Forschung zu rücken, um effiziente Therapiestrategien zu entwickeln. Aufgrund unklarer Leitlinien für die Diagnosefindung einer Sepsis werden in den meisten Studien die schwere Sepsis und der septische Schock untersucht. Moerer et al. haben unterschiedliche Studiendesigns in ihrer Arbeit

berücksichtigt und geben in den westlichen Industrienationen eine Inzidenz der schweren Sepsis von etwa 50 - 120/100.000 Einwohner an [67]. In Deutschland beträgt die Letalität einer schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks 40 % bis 56 % [68]. Damit sterben in Deutschland 60.000 Menschen pro Jahr an einer schweren Sepsis. Somit ist die Sepsis die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Vor allem die Altersgruppe ≥ 65 Jahre hat ein 2,3-fach erhöhtes Risiko, an einer Sepsis zu sterben [69]. Die Krankenhauskosten verdoppeln sich mit dem Auftreten einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks und verursachen Mehrkosten von ca. 15.000 € pro Patient [67].

3.2.3 Pathophysiologie

Der Körper reagiert auf Bakterien, Pilze und Viren mit einer systemischen Antwort. Ursächlich für die Sepsis wurde jüngst noch eine „metabolische Anarchie“ gehalten: eine unkontrollierte, rein proinflammatorische Antwort [70]. Nach Rückschlägen im Versuch die Sepsis mit antiinflammatorischen Medikamenten zu behandeln, wurde diese Theorie verlassen [71]. Heute ist bekannt, dass neben der initialen proinflammatorischen Antwort eine Verschiebung zu einem antiinflammatorischen Status stattfindet [72]. In diesem Zusammenhang spricht man von Immunparalyse, die vor allem neutrophile Granulozyten betrifft [73]. Die Sepsis besitzt also einen 2-phasigen oder gar mehrphasigen Verlauf [74].

3.2.3.1 Auslösung der inflammatorischen Antwort

In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein Schädigungsmodell mit der gleichzeitigen Gabe von Galaktosamin (GalN) und dem Lipopolysaccharid (LPS) zur Auslösung eines septischen Leberschadens eingesetzt. LPS stellt einen Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien dar. Deswegen soll im Folgenden ausschließlich auf die Auslösung der inflammatorischen Antwort durch LPS fokussiert werden.

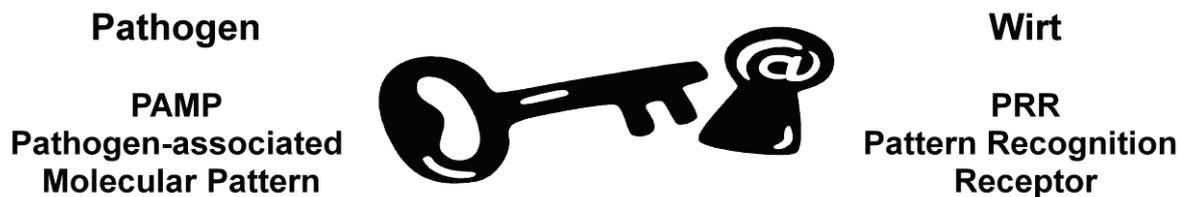


Abb. 3: Auslösung der inflammatorischen Antwort durch das angeborene Immunsystem via PRR auf Immun- und Endothelzellen (entworfen nach [74]).

Das angeborene Immunsystem reagiert auf sogenannte *pathogen-associated molecular Patterns* (PAMPs), wie z. B. das LPS-Molekül. Die *Pattern Recognition Receptors* (PRR), die unter anderem auf der Zelloberfläche von Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten und Mastzellen exprimiert werden, lösen durch Erkennung dieser PAMPs die Immunkaskade aus. Diese beinhaltet die Opsonierung, die Aktivierung des Komplementsystems, die Aktivierung der Koagulationskaskade, die Phagozytose, die Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen und die Induktion der Apoptose [75]. Ein bedeutendes PRR ist der *Makrophage Scavenger Rezeptor* (MSR). Er besitzt unter anderem eine spezielle Spezifität für LPS und sorgt für deren Beseitigung [76]. Ein weiteres Schlüssel-PRR zur Wahrnehmung von LPS ist der *Toll-like-Rezeptor-4* (TLR-4) in einem Komplex mit MD-2 und CD-14 [77]. Sobald dieser Komplex LPS erkannt hat, induziert er über verschiedene Signalwege die Expression einer Reihe von Abwehrgenen des Wirts. Dazu zählen neben inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, antimikrobielle Peptide, kostimulatorische Moleküle, MHC-Moleküle und andere Effektormoleküle, um die Wirtszelle gegen das schädliche Pathogen zu schützen [75].

3.2.3.2 Mediatoren der Inflammation

Das komplexe Netzwerk der Mediatoren der primären und sekundären Immunantwort darzustellen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher werden nur stellvertretend einige Mediatoren diskutiert. Nach Hauber sind die wichtigsten Mediatoren der aktivierte Komplementfaktor C5 (C5a), der Makrophagenmigration-inhibierende Faktor (MIF), das *high mobility group box-1 Protein* (HMGB-1) und Interleukin-17a (IL-17a) [74]. C5a gehört als Teil des Komplementsystems zum angeborenen Immunsystem. In der Initialphase der Sepsis

spielt C5a eine wichtige Rolle. Er beeinflusst Gerinnungsfaktoren, die TLR-4-assoziierte Immunantwort und die Freisetzung von MIF und HMGB-1 [78, 79]. MIF wird in Leukozyten synthetisiert und wirkt proinflammatorisch. Durch die Inhibition von p53-vermittelter Apoptose in aktivierten Makrophagen hält MIF die Inflammation aufrecht. Da es außerdem im Hypothalamus, der Hypophyse und der Nebennierenrinde produziert wird, stellt MIF eine einmalige Verbindung zwischen endokrinem System und dem Immunsystem dar [80]. HMGB-1 wird während der Inflammation vor allem in Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten gebildet [81]. 24 h nach der Induktion einer LPS-induzierten Sepsis steigen die Plasmaspiegel dieses proinflammatorischen Zytokins [82]. HMGB-1 steigert die schädliche Wirkung anderer proinflammatorischer Zytokine und fördert die epitheliale Schrankenstörung [81]. Th-17-Zellen produzieren das Zytokin IL-17a. Dieses stimuliert proinflammatorische Effekte, indem es die Synthese proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α fördert und als Botenstoff zwischen Lymphozyten und Phagozyten dient [83].

3.2.3.3 *Koagulopathie*

Die Inflammation und die Gerinnung sind eng vernetzt. Die Sepsis ist charakterisiert durch eine Aktivierung der Gerinnung, eine Beeinträchtigung der gerinnungshemmenden Mechanismen und eine vermehrte Fibrinablagerung. Während der Inflammation sorgt einerseits IL-6 für die vermehrte Expression von *Tissue Factor*, wodurch die Gerinnung systemisch aktiviert wird. Andererseits ebenen TNF- α und IL-1 einer Abnahme der Aktivität gerinnungshemmender Mechanismen den Weg [84]. Dies führt summa summarum zu einer Hyperkoagulabilität, die mikrovaskuläre Thrombosen mit Störungen der Mikrozirkulation zur Folge haben kann und zur Entwicklung des MOV beitragen können [85].

3.2.3.4 *Endotheldysfunktion und Mikrozirkulationsstörung*

Die Endotheldysfunktion und die Mikrozirkulationsstörung spielen eine Schlüsselrolle im Auslösen und in der Verstärkung von Organdysfunktion und dem Tod des Patienten [86-88]. Direkte und indirekte Interaktionen zwischen der Endothelzelle und

dem Pathogen führen zu einer Änderung des Phänotyps der Endothelzelle. Das Zytokin TNF- α setzt deren Barrierefunktion herab und hat so einen Flüssigkeitsverlust mit Hypovolämie, Hämokonzentration und Stase zur Folge [89, 90]. Ein Verlust von Endothelzellen durch eine vermehrte Apoptose verstärkt die Endotheldysfunktion [86]. Dazu unterhalten apoptotische Endothelzellen die Inflammation über die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Aktivierung von Komplement [90]. Neben der Endothelzell dysfunktion tragen vor allem die Änderung der Hämorrhheologie und die Vasomotordysfunktion zur Mikrozirkulationsstörung bei [88]. Die Änderung der Verformbarkeit von Erythrozyten und Leukozyten bedingt eine Zunahme der kapillären Stase [91, 92]. LPS, TNF- α und IL-1 induzieren über verschiedene Signalwege eine erhöhte Expression von NO, welche als ein kausaler Faktor für die refraktäre Hypotension und die Verminderung des peripheren Widerstandes in der Sepsis angesehen wird [88].

3.2.3.5 Zelltod und Organversagen

“Yes, they still die. Yes, we still do our best not to let them die. And no, ultimately, we do not know why they die, do we?” (Tenhunen 2009) Die Pathogenese des Organversagens in der Sepsis ist komplex und bis heute, wie Tenhunen trefflich formuliert, nicht genau verstanden [93]. Sehr wahrscheinlich tragen die Gewebehypoperfusion und die Hypoxie dazu bei, dass Patienten im septischen Schock an MOV sterben. [94]. Die Arbeitsgruppe um Hotchkiss diskutierte jüngst, dass die massive Apoptose von Immuneffektorzellen und gastrointestinalen Epithelzellen ein bemerkenswertes Phänomen in der Sepsis ist. Der Verlust an Immuneffektorzellen lähmt das Immunsystem und verstärkt im Tiermodell die Sepsis [95].

Das ALV weist pathophysiologisch beachtliche Ähnlichkeiten zum septischen Schock im Bezug auf die Charakteristika systemische Inflammation, Progression zum MOV und funktionelle Organparalyse auf [96].

3.2.4 Management auf der Intensivstation

3.2.4.1 Diagnose

Das frühe Erkennen der Sepsis ist der Schlüssel zur erfolgreichen Behandlung [97]. Die Zeichen und Symptome der Sepsis sind allerdings sehr variabel. Ein zentrales Symptom ist das Fieber. Neben Patienten mit Fieber entwickeln viele Patienten, unter ihnen vor allem ältere Patienten und Patienten mit Urämie, kein Fieber [98]. Diese Abwesenheit einer sichtbaren Akute-Phase-Reaktion geht mit einer erhöhten Mortalität einher [99]. Da trotz eines normalen Blutdruckes bereits eine Organ-Hypoperfusion bestehen kann, sollte das Augenmerk auf Verwirrtheit, Oligurie, Laktatazidose und eine gemischtvenöse Sättigung unter 70% gelegt werden [100]. Marker, die heutzutage zur Diagnosesicherung herangezogen werden, sind IL-6, Prokalzitonin und - mit Einschränkungen - das CRP [101]. Vor allem Prokalzitonin erhöht die Sensitivität und Spezifität der Sepsisdiagnose [102]. Die internationalen Leitlinien empfehlen außerdem die Abnahme von Blutkulturen vor Beginn einer Antibiotikatherapie und bildgebende Verfahren um eine Infektionsquelle gegebenenfalls zu bestätigen [103].

3.2.4.2 Therapie

Die „Surviving Sepsis Campaign“ hat erstmals im Jahre 2004 mit Hilfe der Delphi-Methode internationale Leitlinien zur Therapie der schweren Sepsis erarbeitet. Diese sind 2008 aktualisiert worden [103]. Die Leitlinien beinhalten neben dem bereits oben genannten Punkt der Diagnose weitere Aspekte: die initiale Schockbekämpfung, die antibiotische Therapie, die Herdkontrolle, die Flüssigkeitstherapie, die Vasopressortherapie, die inotrope Therapie, die Therapie mit Kortikosteroiden, die Therapie mit rekombinantem, humanen aktivierten Protein C und die Therapie mit Blutprodukten.

3.2.4.3 Prognose

Mehrere große Studien haben gezeigt, dass die 28-Tage-Mortalität der schweren Sepsis zwischen 17 % und 32 % liegt [104-106]. Patienten mit einem ALV, die eine schwere Sepsis entwickeln, haben eine Mortalität von 95 %, Patienten mit

septischem Schock eine Mortalität von 98 % [107]. Abgesehen von der Mortalität zeigen Daten, dass Patienten nach einer Sepsis über Monate noch Einschränkungen in der *health-related quality of life* (HRQOL) haben [108]. Aber wie können Aussagen zur Prognose gemacht werden? Viele Parameter korrelieren mit der Mortalität. Darunter finden sich u. a. der Baseline-Protein-C-Level [86], das initiale Laktat-Level bei Vorstellung in der Notaufnahme [109], die Thrombozytopenie [110], die Katecholaminsensitivität [111] und die Verformbarkeit der Erythrozyten [112]. Kein Parameter konnte sich bis jetzt in der klinischen Praxis entscheidend durchsetzen. In großen Studien ist zur Prognosevorhersage der APACHE-Score (*Acute Physiology and chronic Health Evaluation Score*) verwendet worden [104, 106]. Dieser setzt sich aus einem akuten Physiologie-Score, dem Alter und der chronischen Gesundheitsevaluation zusammen und korreliert gut mit der Prognose [113].

3.3 Thrombopoetin

3.3.1 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

In den 60er Jahren konnten durch die Entwicklung der halbsoliden Kulturtechnik erste Zellkolonien gezüchtet werden. Dabei wurde festgestellt, dass Leukämiezellen im Knochenmark von Mäusen die Reifung und Proliferation von Granulozyten und Makrophagen unterstützen [114, 115]. Damit war die Grundlage für die Erforschung von Wachstumsfaktoren gelegt. Heute ist bekannt, dass hämatopoetische Wachstumsfaktoren eine Hauptrolle bei der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen während der Hämatopoese spielen. Identifiziert sind IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-15, *steel factor*, *fms-like-tyrosine-kinase-3*, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, Erythropoetin (EPO) und TPO [116]. Durch die neue Möglichkeit des molekularen Klonens der Gene für viele dieser Faktoren in den 1980er und 1990er Jahren konnte die Struktur und deren Rolle in der Physiologie genauer untersucht werden [117]. Neben der Rolle in der Hämatopoese besitzen diese Faktoren auch diverse biologische Funktionen in nicht-hämatopoetischen Geweben [118]. Diese auch als pleiotrop bezeichneten Effekte sind vor allem für den Wachstumsfaktor EPO erforscht worden [119, 120].

3.3.2 Historie

Der menschliche Körper produziert täglich ca. 1×10^{11} Thrombozyten, deren Gesamtzahl im Blut innerhalb enger Grenzen konstant gehalten wird. Bei Bedarf kann die Produktion auf das 10-fache gesteigert werden. Lange Zeit war dessen Regulation unbekannt. Erstmals ist der Regulationsfaktor, das TPO, in den 1950er Jahren im Zusammenhang mit der Thrombozytopenie erwähnt worden [121]. Es dauerte mehrere Jahrzehnte bis durch das Klonen und die Charakterisierung des Proto-Onkogen-v-Mpl-Rezeptors zufällig entdeckt worden ist, dass dieser einen hämatopoetischen Wachstumsfaktor bindet [122]. Der Durchbruch in der Identifizierung wurde 1994 erreicht. Der Ligand des Zytokin-Rezeptors Mpl wurde als Megakaryozyten-Wachstumsfaktor, dem TPO, von mehreren Arbeitsgruppen zeitnah entdeckt und beschrieben [123, 124]. Für TPO werden in der Literatur ebenfalls die Namen Megapoetin und c-Mpl-Ligand gebraucht.

3.3.3 Struktur

TPO wird als 353-Aminosäure-Vorläuferprotein in der Leber, der Niere und im Knochenmark synthetisiert [125]. Nach Entfernung des 21 Aminosäuren langen Signalpeptids besteht TPO aus zwei unterschiedlichen Domänen: einer Amino-terminalen Rezeptor-bindenden Domäne (RBD) und der TPO-Glukan-Domäne (TGD) [123, 124, 126]. Die Rezeptor-bindende Domäne zeigt 20 % Gleichheit und 25 % Ähnlichkeit mit EPO (Abb. 3) [123]. Sie ist zuständig für die Rezeptorbindung, Signalübermittlung und die zelluläre Proliferation [123, 127, 128]. Die TPO-Glukan-Domäne zeigt keinerlei Ähnlichkeit oder Übereinstimmung zu bekannten Proteinen. Diese Domäne verlängert die Halbwertszeit von TPO [129] und erhöht die Sekretion im Sinne eines Propeptides [128, 130]. Die Halbwertszeit von TPO erreicht mit fast 30 Stunden eine erheblich längere Elimination als die anderer hämatopoetischer Wachstumsfaktoren [131].

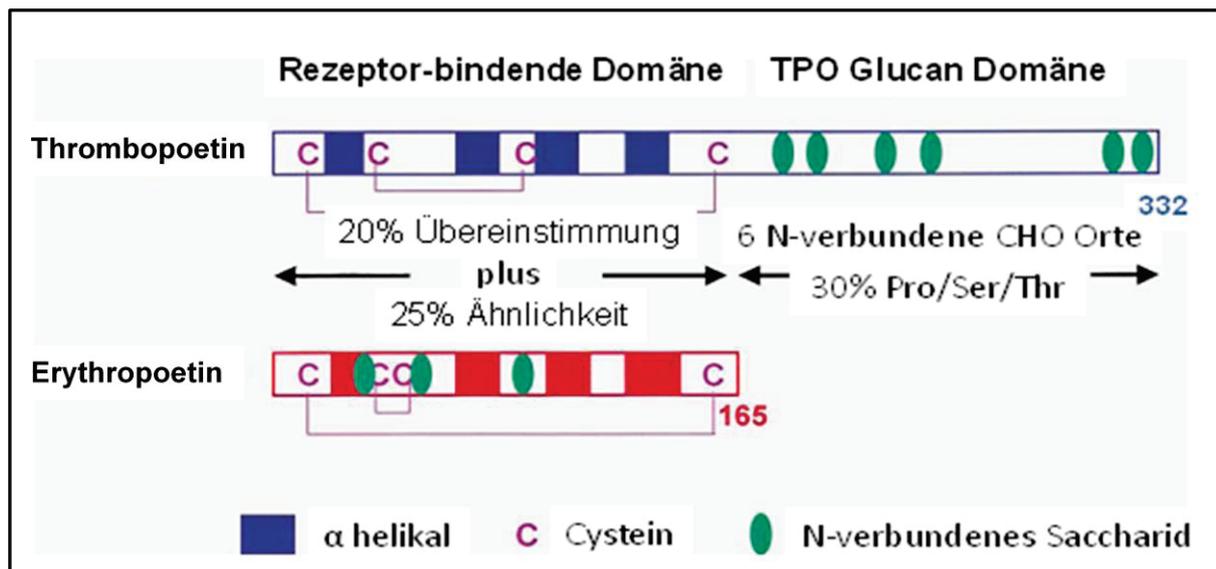


Abb. 4: Vergleich der kodierenden Regionen von Thrombopoetin und Erythropoetin. Die strukturellen Ähnlichkeiten in der Rezeptor-bindenden Domäne sind hervorgehoben. Zu beachten sind die ähnlichen helikalen Strukturen, Schleifen und das "disulfidbond pattern". Die einzigartige Glucandomäne von TPO ist stark glukosyliert. Die N-verbundenen Saccharide sind markiert [132].

3.3.4 Physiologie

Die Anzahl zirkulierender Thrombozyten ist umgekehrt proportional zu den Blut- und Knochenmarkkonzentrationen von TPO. Thrombozyten exprimieren einen TPO-Rezeptor, der den Wachstumsfaktor bindet und aus dem Blut entfernt. Dementsprechend steigen die TPO-Konzentrationen bei sinkender Thrombozytenzahl im Blut [133]. Bei massiver Thrombozytopenie wird die Transkription von TPO in Bindegewebszellen des Knochenmarks erhöht [125]. Ein weiterer Regulationsmechanismus wird bei reaktiver Thrombozytose beobachtet: der inflammatorische Marker IL-6 stimuliert die TPO-Produktion in der Leber [134]. Neben diesen Mechanismen existieren noch andere, nicht endgültig identifizierte, TPO-unabhängige Regulationsmechanismen, da sowohl in TPO-knock-out- als auch in TPO-Rezeptor-knock-out-Mäusen die Megakaryozyten und die Thrombozytenmasse lediglich reduziert sind [135, 136].

Die TPO-Bindung an seinen Rezeptor verhindert die Apoptose von Megakaryozyten [137], erhöht deren Größe, Ploidie sowie deren Anzahl und stimuliert die Expression Thrombozyten-spezifischer Marker [138, 139]. TPO weist in Kombination mit

hämatopoetischen Wachstumsfaktoren synergistische Effekte auf das Wachstum von myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen auf [140, 141]. Die Produktion primitiver pluripotenter Stammzellen wird ebenfalls von TPO und seinem Rezeptor stimuliert [136, 142]. Hingegen besitzt TPO einen geringen Effekt auf die Thrombozyten selbst [143]. In pharmakologisch hohen Dosen erhöht TPO die Reaktivität von Plättchen. Sie benötigen für einen Gerinnungsprozess halb so viel Adenosin-Diphosphat [129, 144]. TPO führt zur Expression Thrombozyten-spezifischer Proteine auf Megakaryozyten [145]. Steigende Temperaturen erhöhen die TPO-Clearance durch Plättchen [146].

3.3.5 Pleiotrope Effekte

Die Untersuchung von biologisch aktiven Molekülen, die zahlreiche Signalprozesse auslösen, ist in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der experimentellen Forschung gerückt [118, 147]. Ähnlich einer hämatopoetischen Zelllinie, die für ihre Proliferation und Differenzierung mehrere Proteine mit unterschiedlichen Funktionen benötigt [148, 149], könnten für eine suffiziente Therapie von zahlreichen Erkrankungen Proteine mit unterschiedlichen Funktionen, sogenannte pleiotrope Substanzen, in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Für den hämatopoetischen Wachstumsfaktor EPO sind solche Eigenschaften nachgewiesen worden. In verschiedenen Geweben wirkt EPO als antiapoptotische und Gewebe-protective pleiotrope Substanz [119, 150, 151]. Auch in einem Modell des akuten septischen Leberversagens konnte die Gabe von EPO die Schwere des Leberschadens reduzieren [152]. Die oben dargestellte Ähnlichkeit der Molekularstrukturen von TPO und EPO sowie deren gemeinsame Stimulation erythroider Progenitorzellen [153] zeigt deren Gemeinsamkeiten, die sich auch in anderen Signalprozessen überschneiden könnten. Auch für den Wachstumsfaktor TPO sind bereits pleiotrope Effekte beschrieben: Die Gabe von TPO konnte die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität am Mausmodell signifikant abschwächen, indem es die Apoptose und Vakuolisierung verminderte und zu einer geringeren Mortalität führte [154]. Konträre, unerwartet starke proapoptotische Effekte zeigte TPO auf reife neuronale Zellen in einem Modell des hypoxischen Hirnschadens [155].

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in einem experimentellen GalN/LPS-Modell untersucht, ob das TPO/TPO-R-System, ähnlich dem EPO/EPO-R-System, die Schwere des septischen Leberschadens reduzieren und die Letalität senken kann.

4 ZIELE DER STUDIE

Ziel dieser experimentellen Studie war es zu untersuchen, in welchem Ausmaß und durch welche Mechanismen der hämatopoetische Wachstumsfaktor TPO in einem GalN/LPS-Modell den akuten septischen Leberschaden reduzieren kann. Mittels der Intravitalmikroskopie (IVM) wurde das Lebergewebe nach Applikation von GalN/LPS auf Mikrozirkulationsstörungen mit und ohne Gabe von TPO untersucht. Zusätzlich zu den in vivo Studien wurden histologische, immunhistochemische, laborchemische und molekularbiochemische Untersuchungen durchgeführt.

Folgende wesentliche Fragestellungen wurden beantwortet:

- Wie verhält sich die TPO-Rezeptorexpression in der Leber bei einer akuten massiven Leberschädigung?
- Kann die Applikation von TPO die hepatische Mikrozirkulation vor dem durch GalN/LPS gesetzten Schaden schützen?
- Kann die starke proinflammatorische Antwort, die durch die GalN/LPS-Gabe ausgelöst wird, durch TPO reduziert werden?
- Kann die massive Apoptose, die beim ALV eintritt, mit Hilfe von TPO verringert werden?
- Kann die Gabe von TPO beim septischen Leberversagen als therapeutischer Ansatz in der Praxis dienen?

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche C57BL/6J Mäuse (Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 8 - 10 Wochen und einem Körpergewicht (KG) von ca. 22 g benutzt. Die Tiere wurden vor Beginn der Versuche einige Tage in klimatisierten Räumen bei 12 h Tag-/Nachtrhythmus der Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter für Nager (sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gehalten. Das Tierversuchsvorhaben wurde entsprechend dem Tierschutzgesetz und der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät Rostock der Universität Rostock durchgeführt und war durch die Genehmigungsbehörde des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Mecklenburg-Vorpommern mit Aktenzeichen LVL-MV/TSD/7221.3-1.1-002/05 genehmigt.

5.2 Modell

5.2.1 Prämedikation mit Thrombopoetin

Den Tieren wurde 24 h vor der Induktion des akuten Leberversagens verblindet entweder eine niedrige Dosis TPO (12,5 µg/kg KG; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland; TPO_{ND}), eine hohe Dosis TPO (75 µg/kg KG; Sigma-Aldrich; TPO_{HD}) oder physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert. Thrombopoetin wurde in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst. Den Tieren wurde somit ein Volumen von 100 µl/10 g KG i.p. injiziert. Die gewählten Dosen orientierten sich an Versuchen anderer Arbeitsgruppen, die bereits pleiotrope Effekte von Thombopoetin am Tiermodell untersucht haben [154, 155].

5.2.2 Induktion des akuten Leberversagens

Für die Induktion des ALV wurde den Tieren intraperitoneal 720 mg/kg KG GalN (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 10 µg/kg KG LPS von Escherichia

coli (Serotyp 0128:B12, Sigma-Aldrich) gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung verabreicht. Tiere ohne die Induktion eines ALV dienten als Sham-Kontrolle. Die Konzentrationen von GalN und LPS wurden von bereits veröffentlichten Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen übernommen [15, 152, 156-158].

5.2.3 Anästhesie und chirurgische Präparation

Die Versuchstiere wurden zuerst intraperitoneal mit 75 mg/kg KG Ketamin (Ketamin®, Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Germany) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompus®, Bayer Vital GmbH, Bayer HealthCare, Deutschland) anästhesiert. Den narkotisierten Tieren wurden mit der Haarschneidemaschine AESCULAP® Favorita II (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) die Hals- und Nackenregion rasiert, um später eine saubere mikrochirurgische Präparation zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Tiere in Rückenlage auf einer temperaturvariable Heizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) positioniert, um eine konstante Körpertemperatur von 36 – 37° C während der Laparotomie und den anschließenden IVM-Studien aufrecht zu erhalten. Anschließend wurde unter dem Stereomikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) die rechte Vena jugularis mikrochirurgisch präpariert. Nach dem Hautschnitt und der Dissektion des subkutanen Fettgewebes wurde die rechte Vena jugularis isoliert. Über einen kleinen Schnitt auf der anterioren Seite der Vene wurde ein Polyethylen-Katheter (PE 50, 0,28 mm ID, 0,61 mm OD, Smiths Medical International Ltd., Kent, UK) eingeführt und mit zwei Fäden fixiert. Der Katheter diente zur Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen sowie von Ketamin zur Aufrechterhaltung der Narkose. Nun wurden eine mediane und eine U-förmige Laparotomie kombiniert und die Gefäße der Bauchwand mittels eines Kauters ligiert. Die beiden oberen Lappen der Bauchwand wurden beidseits kranial dicht neben dem Tier in Häkchen auf Magnetstützen auf der Heizplatte fixiert. Der linke Leberlappen wurde vorsichtig unter Vermeidung eines chirurgischen Traumas von den Bändern gelöst. Der inferiore Anteil des Lappens wurde im Uhrzeigersinn um 180° gedreht und auf einer aus Plastilin geformten Halterung, der der Leberform angepasst worden war, positioniert. Diese Prozedur wurde mit zwei angefeuchteten Wattetupfern durchgeführt. Der anatomisch inferiore, nun oben liegende Anteil des

linken Leberlappens wurde danach mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung benetzt. Anschließend wurde der Lappen mit einem dünnen, runden Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) bedeckt. Der restliche freie Teil der Leber wurde mit einer dünnen Sauerstoff-impermeablen Folie geschützt. Die offene Bauchhöhle wurde mit einer zuvor in 37° C warmer physiologischer Kochsalzlösung feucht-warm getränkten Kompresse vor dem Austrocknen geschützt.

5.2.4 Experimentelle Gruppen

Die Vorbehandlung der Tiere mit TPO bzw. physiologischer Kochsalzlösung erfolgte verblindet 24 h vor Auslösung des ALV. Die Einleitung des ALV mittels GalN/LPS wurde 6 h vor der Intravitalmikroskopie durchgeführt. Die Versuchsreihe beinhaltete folgende vier Gruppen (jeweils n = 5 - 10 Tiere) :

TPOhD-Gruppe: Der hoch-Dosis-TPO Gruppe wurde 24 h vor Auslösung des ALV 75 mg/kg KG TPO intraperitoneal und 6 h vor IVM GalN/LPS intraperitoneal appliziert.

TPOnD-Gruppe: Der niedrig-Dosis-TPO Gruppe wurde 24 h vor Auslösung des ALV 12,5 mg/kg KG TPO intraperitoneal und 6 h vor IVM GalN/LPS intraperitoneal appliziert.

Kontrollgruppe: Der Kontrollgruppe wurde 24 h vor Auslösung des ALV physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal und 6 h vor IVM GalN/LPS intraperitoneal appliziert.

Sham-Gruppe: Die Sham-Gruppe wurde intravitalmikroskopisch untersucht und diente zur Erfassung physiologischer Parameter.

5.3 Methoden

5.3.1 Mikrozirkulation der Leber

Die in-vivo-Aufnahmen der Leber wurden mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops, welches mit einer 100-W-Quecksilber-Lampe und Filtern für blaue und grüne Epi-Illumination (Axiotech Vario; Zeiss, Jena, Deutschland) ausgestattet ist, aufgenommen. Die mikroskopischen Bilder sind mit einem Wasser-Immersion-Objektiv (x20/0,50 W; Zeiss) eingestellt und mit einer *charge*

coupled device (CCD) Videokamera (FK 6990A-iQ, Pieper, Berlin, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde auf ein Videoband aufgezeichnet worden. Mit einem Videozeitgenerator (Fora Video Timer, model VTG33, Fora Company limited, Japan) wurde gleichzeitig das Datum und die Uhrzeit in die Aufnahme eingeblendet. Anschließend wurden die Aufnahmen offline mit Hilfe des CapImage Programms (CapImage; Zeintl, Heidelberg, Deutschland) Bild-für-Bild in 424-facher Vergrößerung ausgewertet (Abb.5).

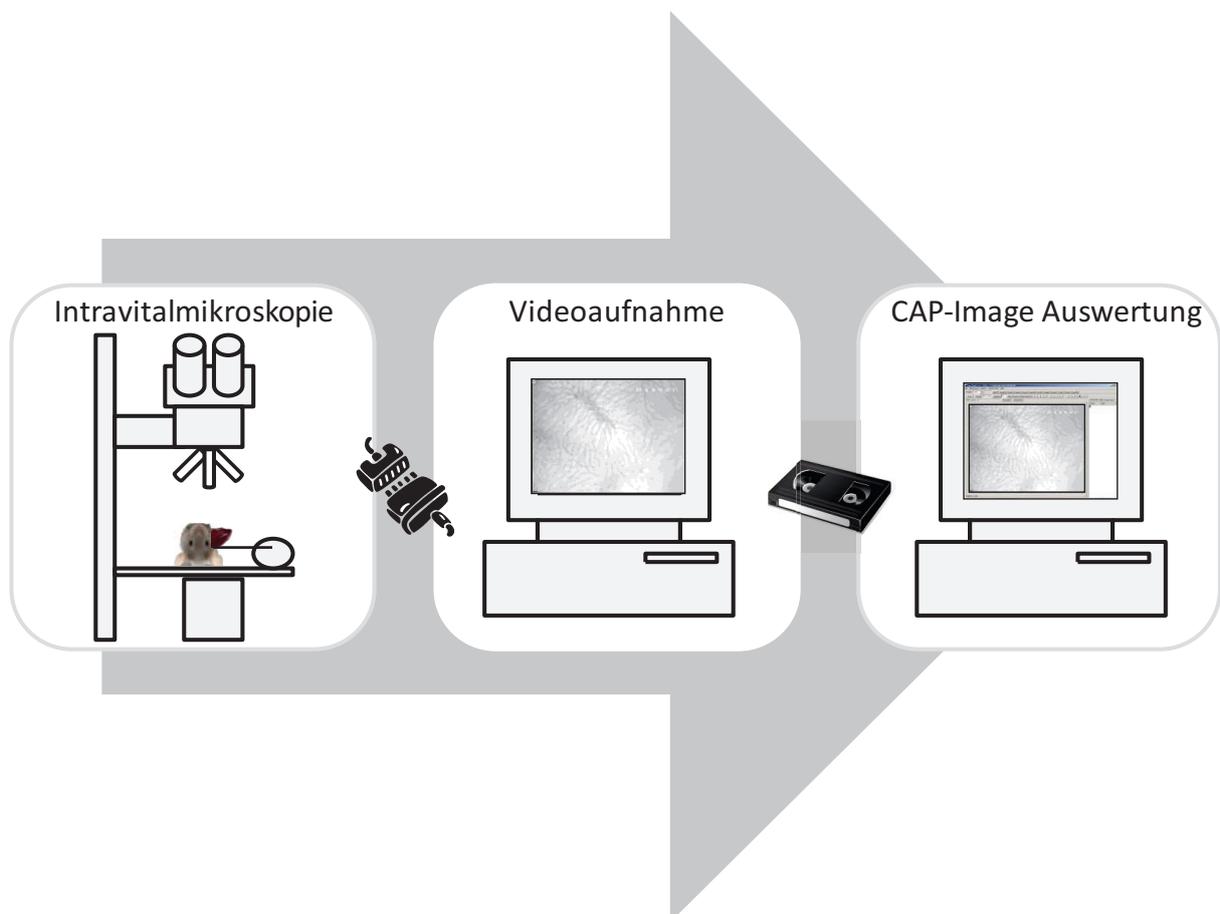


Abb. 5: Arbeitsablauf der intravitalmikroskopischen Fluoreszenzmikroskopie und deren Auswertung.

5.3.1.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie - Grundlagen

Die Fluoreszenzmikroskopie vereint den Aspekt der Vergrößerung von Strukturen mit einer intrinsischen Selektivität. Dies bedeutet, dass sie die zu untersuchenden Strukturen signalintensiv darstellt und den Hintergrund signallos belässt. Die Voraussetzung für eine solche Darstellung ist das Fluoreszieren der zu

untersuchenden Struktur. Fluoreszenz entsteht, wenn Licht einer Wellenlänge durch ein Molekül absorbiert wird und dieses dadurch anregt (Exzitation). Anschließend fällt dieses Molekül wieder in einen Zustand niedrigerer Energie und sendet dabei innerhalb von Nanosekunden Licht energieärmerer Wellenlänge aus (Emission). Die Verschiebung der Wellenlängen zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum wird als Stokesverschiebung bezeichnet. In der Praxis wird bei der Fluoreszenzmikroskopie das anregende Licht herausgefiltert, so dass für den Betrachter nur die Fluoreszenz sichtbar ist. In der Fluoreszenzmikroskopie bedient man sich synthetisch hergestellten Molekülen, den Fluorophoren, die spezifisch an Komponenten biologischer Systeme haften. Die Eigenschaften der Fluorophore werden durch das Elektron bestimmt, welches sich in der äußersten Orbitalhülle aufhält. Trifft Licht (Photonen) auf dieses Elektron im energetischen Grundzustand, kann durch die Energie des Lichtes das Elektron in ein Orbital mit einem höheren Energiezustand gelangen. Innerhalb von femto-Sekunden wird dieser hoch-Energie Status wieder verlassen. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Licht frei (Fluoreszenz-Emission).

Technisch wird die moderne Fluoreszenzmikroskopie mittels Epi-Illumination umgesetzt (Abb. 6). Das bedeutet, dass im Objektiv ein dreiteiliger Kondensator eingebaut ist. Dieser sorgt dafür, dass das Fluoreszenz-Emissionslicht für den Betrachter sichtbar wird, hingegen das Exzitationslicht geblockt wird. Da sich die Wellenlängen überschneiden, ist ein Lichtstrahlsplitter, ein dichromatischer Spiegel, nötig, der das Exzitationslicht vom Emissionslicht trennt. Ein Exzitationsfilter selektiert das Spektrum der Wellenlängen des Exzitationslichtes vor. Darüber hinaus werden durch einen Grenz-Filter kurze Wellenlängen aus dem Spektrum entfernt. Alle drei Filter haben eine sehr spezifische Wellenlängen-Selektivität. Am Mikroskop sind mehrere Filter zur Einstellung für unterschiedliche Fluorophore vorhanden. Eine Quecksilberlampe dient als Lichtquelle, weil diese eine sehr hohe Lichtausbeute pro Oberflächenanteil aufweist und somit ausreichend Energie zur Anregung von Fluorophoren besitzt.

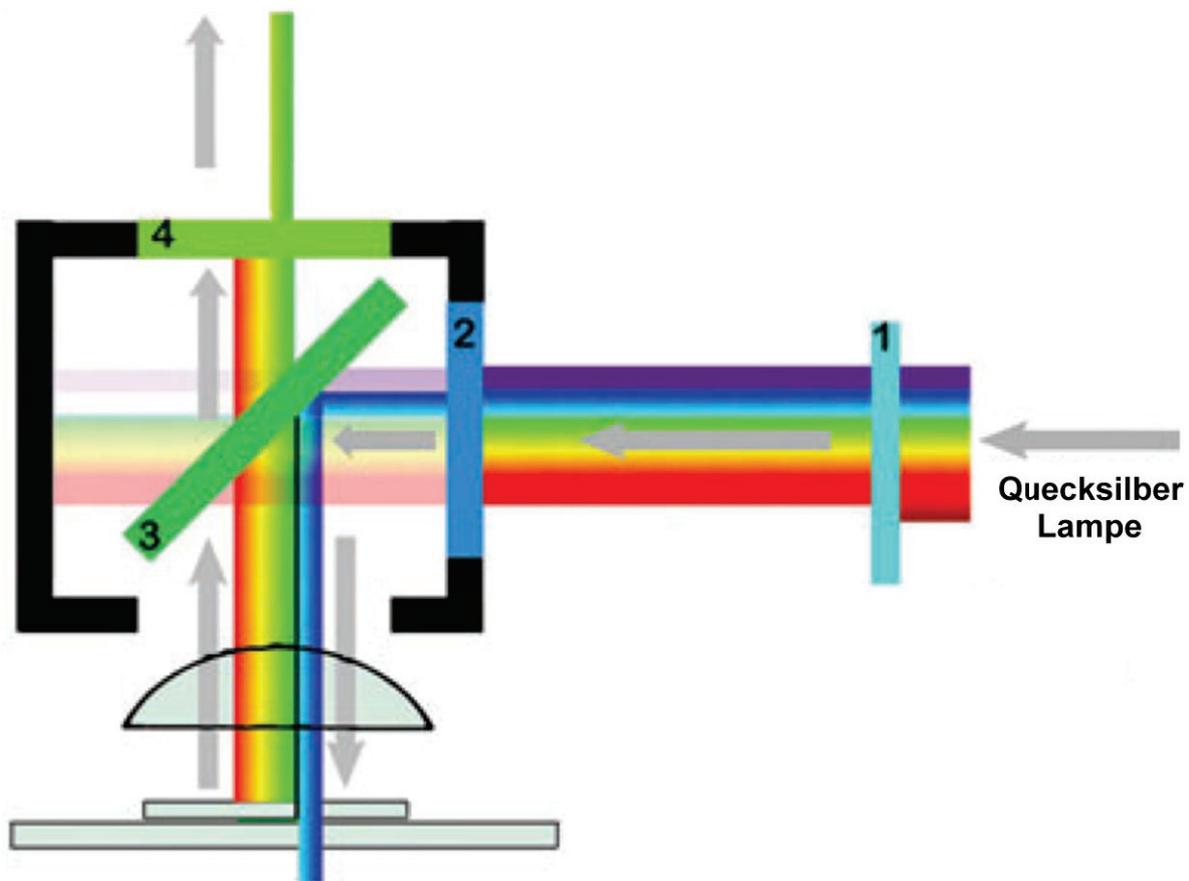


Abb. 6: Prinzip der Epi-Illumination mit Hitzefilter (1), Exzitationsfilter (2), dichromatischem Spiegel (3) und Grenzfilter (4) (modifiziert nach [159]).

5.3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

In dieser Studie wurden die Fluorophore Natriumfluoreszein, Rhodamin-6G und Bisbenzimid verwendet.

Na-Fluoreszein (Merck, Darmstadt, Deutschland), ein niedermolekulares Molekül ($C_{20}H_{12}Na_2O_2$; Molekulargewicht 376 g/mol), diffundiert durch das gefensterte Lebersinusendothel in den Extravasalraum und wird zügig von den Hepatozyten v. a. im perizentralen Bereich aufgenommen. Dadurch erscheinen die Hepatozyten hell und die Sinusoide dunkel. Nach intravenöser Gabe von $2 \mu\text{mol/kg KG}$ Na-Fluoreszein wurde die Blaulicht Epi-Illumination (450 - 490/> 580 nm, Exzitation-Emission-Wellenlänge) genutzt, um den Gewebekontrast zu verstärken und die Blutperfusion in den Lebersinusoiden zu beurteilen (Abb. 7).

Rhodamin-6G (Merck, Darmstadt, Deutschland) akkumuliert abhängig vom Membranpotential in Leukozytenmitochondrien. $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ mit einem Molekulargewicht von 479 g/mol wird deshalb für die Darstellung von Leukozyten genutzt. In der Studie wurde 1 $\mu\text{mol/kg}$ KG intravenös appliziert und anschließend unter Grünlicht-Epi-Illumination (530 - 560/> 580 nm) das intrahepatische Leukozyten-Fließverhalten untersucht (Abb. 8).

Bisbenzimid H 33258 (Merck, Darmstadt, Deutschland) wird von Hepatozyten aufgenommen und in den DNA-Doppelstrang integriert. Unter Licht der Wellenlänge von 330 - 380 nm fluoresziert Bisbenzimid. Apoptotische Zellen sind anhand ihrer charakteristischen Kernveränderungen wie Kondensation und Fragmentation erkennbar.

5.3.1.3 *Sinusoidale Perfusion*

Intravitalmikroskopisch wurden nach Na-Fluoreszein-Gabe Videoaufnahmen der Portalfelder der Leber an 10 verschiedenen Stellen pro Tier für jeweils 20 s aufgenommen. Anschließend wurden diese Videomitschnitte am CapImage wie folgt analysiert: eine 200 μm lange Linie wurde im rechten Winkel in die Mitte einer fiktiven Linie zwischen Zentralvene und Portalfeld gelegt (Abb. 7) und die die Linie schneidenden Sinusoide wurden gezählt. Nun wurde über einen Zeitraum von 20 s die Anzahl der nicht perfundierten Sinusoide beurteilt. Die Prozentzahl von perfundierten Sinusoiden bezogen auf die Gesamtanzahl aller Sinusoide diente als Parameter, um die hepatische nutritive Perfusion zu bewerten. Insgesamt wurden pro Tier 10 Leberläppchen betrachtet.

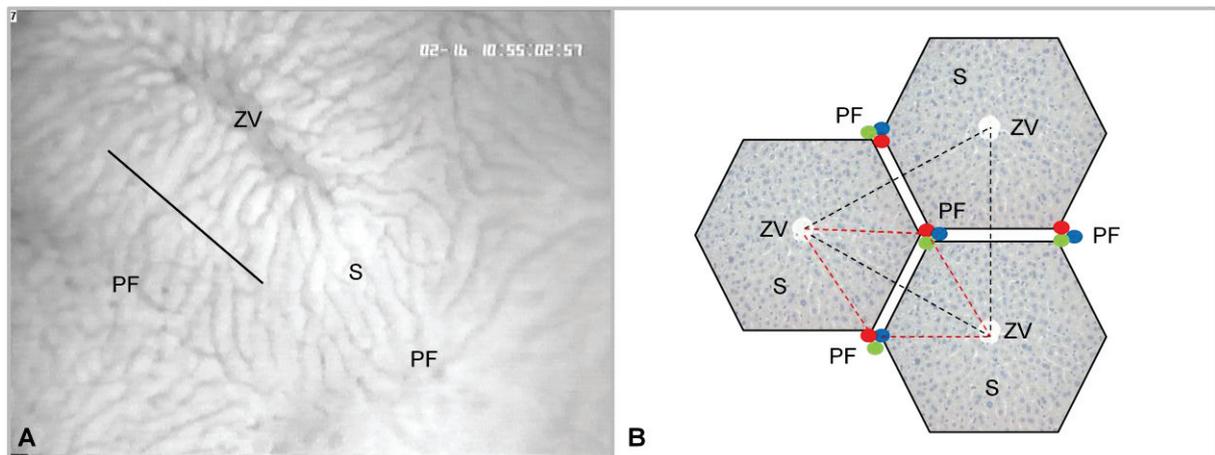


Abb. 7: (A) Intravitalmikroskopisch betrachteter Ausschnitt eines Leberazinus in 424-facher Vergrößerung nach Natriumfluoreszein-Gabe mit 200 μm langer Linie zur Auswertung der sinusoidalen Perfusion. (B) Schematischer Aufbau der Leber aus hexagonalen Leberlappen mit portalvenösem Blut, welches aus dem Portalfeld (PF) über die Sinusoide (S) in die Zentralvene (ZV) fließt. Schwarz gestrichelt ein Portalläppchen mit einem PF aus A. interlobularis, V. interlobularis und Gallengang im Zentrum. Rot gestrichelt ein Leberazinus.

5.3.1.4 Mikrovaskuläre Leukozyten-Akkumulation

Rhodamin-6G markierte die Leukozyten deutlich (Abb. 8). Mit Hilfe des CapImage-Programms wurde ein rechteckiges Fenster auf einen Ausschnitt zwischen Portalfeld und Zentralvene gelegt, in dem die Aufnahmequalität eine Beurteilung der Leukozyten zuließ. So konnten alle stationären Leukozyten gezählt werden, die länger als 20 s in den Sinusoiden stagnierten. In den Ergebnissen wurde die totale Anzahl von stagnierenden Leukozyten pro Gebiet in n/mm^2 angegeben. Insgesamt wurden pro Tier 10 Gesichtsfelder beurteilt.

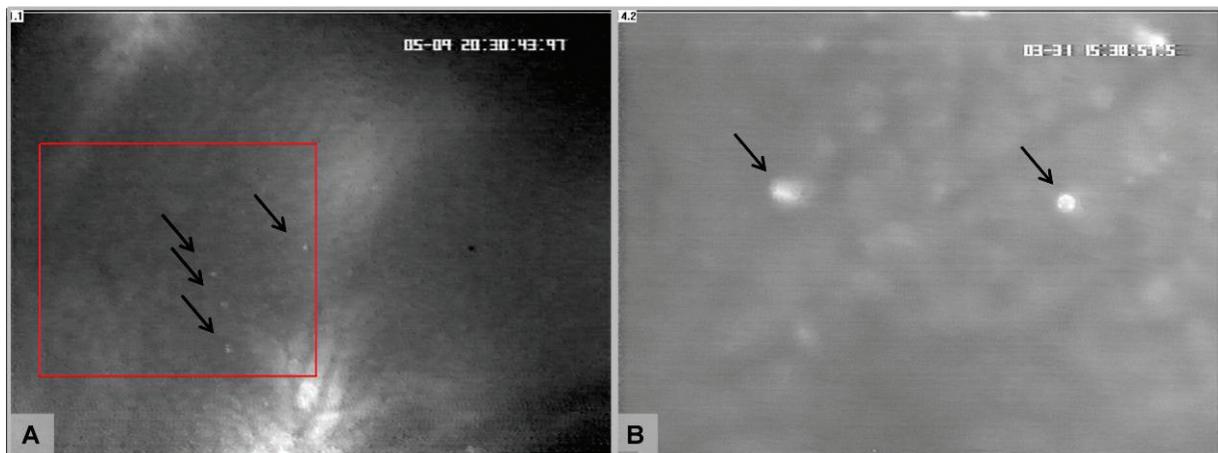


Abb. 8: (A) Mikrovaskuläre Leukozytenadhäsion nach Rhodamin-6G Injektion in 424-facher Vergrößerung, Pfeile markieren Leukozyten. (B) Hepatozelluläre Apoptose nach intravenöser Bisbenzimid-Gabe in 823-facher Vergrößerung, Pfeile markieren typisch kondensierte Nuclei apoptotischer Zellen.

5.3.1.5 Hepatozelluläre Apoptose

Unter UV-Licht konnten apoptotische Zellen identifiziert werden, da sich ihre Nuclei erheblich heller darstellen (Abb. 8). Dies ist die Folge einer vermehrten Bisbenzimid-Fluoreszenz im Kern aufgrund der morphologischen Veränderungen, die eine apoptotische Zelle kennzeichnen: Kondensation, Margination und Fragmentation des Kerns. Die apoptotischen Zellen wurden pro Bildausschnitt gezählt und in Anzahl/mm² angegeben. Insgesamt wurden pro Tier 10 Gesichtsfelder beurteilt.

5.3.2 Probeentnahme und Analyse

5.3.2.1 Blutentnahme

Nach Beendigung der IVM-Aufnahmen wurde den Tieren aus der Vena cava inferior 1-2 ml Vollblut entnommen und in einem Ca²⁺-EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert. Im Anschluss wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketamin/Xylazin getötet. Nach Erstellung eines Blutbildes wurde das Blut in den Röhrchen 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Das Plasma wurde bis zur Durchführung weiterer Analysen bei - 20° C eingefroren.

5.3.2.2 *Gewebeproben*

Direkt nach dem Tod des Tieres wurde die Leber entnommen und gewogen. Anschließend wurde die Leber zur Asservierung aufbereitet. Ein Anteil diente für spätere molekularbiochemische Analysen und wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei - 80° C gelagert. Ein weiterer Anteil wurde ebenfalls für folgende Analysen in TissueTek (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, schockgefroren und in Aluminiumfolie geschützt bei - 20° C asserviert. Der letzte Anteil der Leber wurde für histologische Gewebeschnitte in 4%igem phosphatgepufferten Formalin für 2 - 3 Tage fixiert und dann in Paraffin eingebettet.

5.3.3 **Vollblut- und Serumanalytik**

5.3.3.1 *Vollblutanalytik*

Das Blutbild wurde mittels eines automatischen Zellzählers (Sysmex KX21, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) ausgewertet.

5.3.3.2 *Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Serum*

Die Transaminasen sind in den Hepatozyten synthetisierte Enzyme und dienen als Parameter der hepatozellulären Integrität. Zu ihnen zählen ALT (Alaninaminotransferase), AST (Aspartataminotransferase) und GLDH (Glutamatdehydrogenase). ALT ist vor allem im Zytoplasma periportalier Hepatozyten lokalisiert und führt dadurch bereits bei geringgradiger Störung der Membranpermeabilität zu einem Anstieg in der Blutbahn. AST kommt zu 1/3 im Zytosol vor und ist zu 2/3 in den Mitochondrien lokalisiert. AST ist während des Zelltodes von Hepatozyten verstärkt in der Blutbahn nachweisbar. GLDH kommt in Mitochondrien vor allem von perivenösen Hepatozyten vor, weshalb dessen Anstieg als Marker für eine stattgefundenen Zellnekrose angesehen wird. Die Aktivität der Transaminasen wurde spektrophotometrisch nach Bergmayer et al. [160] mit dem Hitachi 704 Automatic Analyser (Boehringer, Mannheim, Deutschland) gemessen.

5.3.3.3 *Bioplex Protein-Array-System*

Im Serum wurden die Aktivitäten der proinflammatorischen Enzyme IL-6 und TNF- α mit dem Protein-Array-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bestimmt. Das System kann in einer Probe, die in eine Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert ist, simultan nach dem Sandwich-Elisa-Prinzip verschiedene Proteine messen. Dies ist technisch durch spezifische Antikörper, die an fluoreszenzmarkierte Polystyrenkügelchen (Beads) gebunden werden, möglich. In diesem Fall wurden das Endogen® Mouse IL-6 ELISA Kit (Pierce Biotechnology, Rockfort, USA) und das Endogen® Mouse TNF- α ELISA Kit (Pierce Biotechnology, Rockfort, USA) genutzt.

5.3.4 **Histologie und Immunhistochemie**

Aus den in Paraffin eingebetteten Lebergeweben sind 4 μm dicke Schnitte gefertigt und auf Objektträgern fixiert worden.

5.3.4.1 *Thrombopoetin-Rezeptor (c-mpl)*

Zuerst sind die in Paraffin eingebetteten Schnitte der Leber mittels Xylol entparaffiniert worden. Dann wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Antikörper von Kaninchen gegen Mäuse-, Ratten- und humanen-TPO-Rezeptor (1:100; 06-944; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mittels eines biotinylierten Kopplungsantikörpers und HRP-markiertem Streptavidin basierten Visualisierungs-Kits (LSAB™ + Kit/HRP; DakoCytomation) laut Vorschrift behandelt. Die HRP-Bindungsstellen wurden mittels eines AEC-Chromogens (DakoCytomation) sichtbar gemacht. Nun konnten die immunhistochemisch gefärbten Leberschnitte auf die Expression von TPO-Rezeptor-positiven Zellen untersucht werden. Dazu wurden 30 Gesichtsfelder pro Schnitt jeweils unter Vergrößerung mit einem 40er Objektiv ausgewertet und die Anzahl TPO-Rezeptor-positiver Zellen pro Quadratmillimeter (n/mm^2) bestimmt.

5.3.4.2 Cleaved Caspase-3

Für die immunhistochemische Färbung von cleaved Caspase-3 sind 4 µm Schnitte der in Paraffin eingebetteten Proben mit Xylol wieder entparaffiniert worden und über Nacht bei 4°C mit einem Kaninchen-polyklonalen Antikörper gegen Mäuse-, Ratten- und Menschen-cleaved Caspase-3 (1:500; 9661 Lot 15; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) inkubiert worden. Nach 24 h sind die Schnitte mit dem Peroxidase-konjugierten Ziegen-anti-Kaninchen-IgG/HRP Sekundärantikörper (1:20; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) für die Entwicklung der cleaved Caspase-3 inkubiert worden. 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation) wurde als Chromogen genutzt und die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. So war es möglich, die endogene Expression der großen Fragmente (17/19 kDa) aktivierter cleaved Caspase-3 - ohne gleichzeitige Markierung ungespaltener Caspase-3 - nachzuweisen. Die cleaved Caspase-3-positiven Hepatozyten wurden in 30 Gesichtsfeldern eines Schnittes unter Vergrößerung mit dem 40er Objektiv gezählt und als apoptotische Zellen pro Quadratmillimeter (n/mm^2) angegeben.

5.3.5 Molekularbiologie

Für die Western-Blot Protein-Analyse zur Bestimmung der Expression von cleaved Caspase-3 ist Lebergewebe im Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 0,02 % NaN_3 , 0,2 mM PMSF) mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100 v/v; Sigma Aldrich) homogenisiert worden. Anschließend wurde das Lebergewebe mit dem Protease-Inhibitor-Cocktail 30 min auf Eis inkubiert, 15 min mit 10.000 Umdrehungen/min zentrifugiert und der Überstand als Gesamt-Proteinfraktion abpipettiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe von *bicinchinoic acid* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und Cu^{2+} -Sulfat (Sigma-Aldrich) mit Rinder-Albumin als Standard verdünnt und bestimmt. 60 µg Protein/Spur wurden auf ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel (12 %) aufgetragen, elektrophoretisch bei 20 mA und 40 mA nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) geblottet. Nun wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Polyvinylidendifluorid-Membran-Lösung geblockt und 120 min mit dem Kaninchen-Primärantikörper gegen cleaved-Caspase-3 (Asp 175; 1:1000; Cell

Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland) und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, dem Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Ig G (1:2000, Cell Signalling Technology) inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe der luminolverstärkenden Chemilumineszenzmethode (ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) visualisiert und mit dem ChemiDoc-XRS-System (Quantity One, Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) digitalisiert. Unter Berücksichtigung der β -Aktin Bande (monoklonaler Maus-anti- β -Aktin Antikörper; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) als Ladekontrolle sind die Ergebnisse mit der Software Total Lab (Nonlinear Dynamics, New Castle upon Tyne, UK) densitometrisch ausgewertet worden.

5.4 Zusammenfassung des experimentellen Protokolls

Um den Einfluss von Thrombopoetin auf das durch GalN/LPS ausgelöste ALV zu untersuchen, wurden 4 Gruppen (je n = 5 - 10 C57BL/6J Mäuse) gebildet:

1. **Sham(S)-Gruppe**

2. **Kontroll(KON)-ALV-Gruppe**

(-30 h: 0,9%-NaCl-Lösung; - 6 h: 720 mg/kg KG GalN + 10 μ g/kg KG LPS)

3. **TPO_{nD}-ALV-Gruppe**

(- 30 h: 12,5 μ g/kg KG TPO; - 6 h: 720 mg/kg KG GalN + 10 μ g/kg KG LPS)

4. **TPO_{hD}-ALV-Gruppe**

(- 30 h: 75 μ g/kg KG TPO; - 6 h: 720 mg/kg KG GalN + 10 μ g/kg KG LPS)

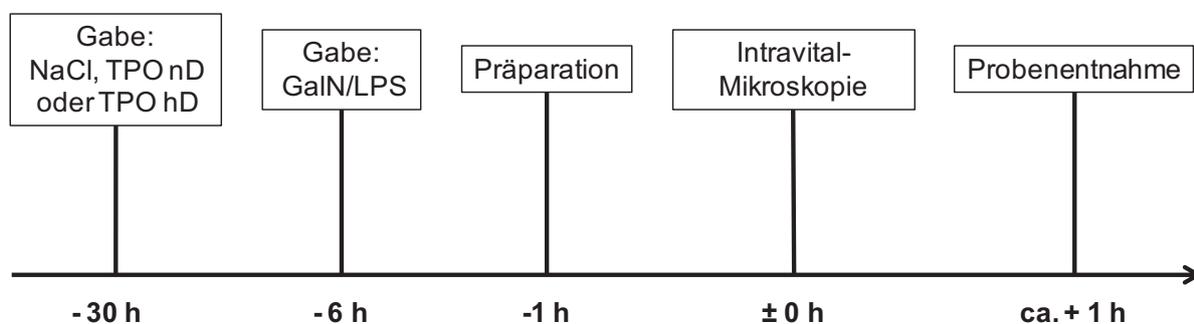


Abb. 9: Experimentelles Protokoll

Nach Anästhesie und Präparation der Tiere wurde die Leber intravital mikroskopiert, wobei folgende Parameter analysiert wurden (jeweils 10 Gesichtsfelder):

1. Sinusoidale Perfusion
2. Leukozyten-Endothel-Zell-Interaktion in Sinusoiden
3. Hepatozelluläre Apoptose

Anschließend wurden Vollblut- und Plasmaanalysen sowie immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen vorgenommen.

5.5 Statistik

Alle aus den Analysen (Mikrozirkulation, Vollblut- und Plasmawerte, Immunhistologie und Molekularbiologie) gewonnenen Daten wurden in Excel-Tabellen übertragen und mit Hilfe dieses Datenverarbeitungsprogramms Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) berechnet. Mit dem Programm Sigma Plot 9.0 (Jandel Corp., San Rafael, USA) sind die Daten in Graphen umgesetzt worden. Alle Daten sind mit ihrem Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Statistik wurde mit dem Programm Sigma Stat 3.0 (Jandel Corp., San Rafael, USA) berechnet. Nach Testung der Normalverteilung der Werte wurden die Gruppen gegeneinander mit der einfaktoriellen ANOVA-Analyse und nachfolgendem Paarvergleich nach Holm-Sidak oder Dunn durchgeführt. Eine statistische Signifikanz galt für $p < 0,05$.

6 ERGEBNISSE

6.1 Intravitalmikroskopie

6.1.1 Sinusoidale Perfusion

Nach der Gabe von Natriumfluoreszin zeigte sich intravitalmikroskopisch eine nahezu komplette Durchblutung aller Sinusoide in der gesunden Sham-Gruppe. Die Applikation von GalN/LPS schränkte die hepatische Perfusion im Mittel um ca. 15 % ein (Abb. 10 A). Die vorherige Behandlung mit niedrig dosiertem TPO verminderte den Perfusionsschaden im Vergleich zu den mit GalN/LPS behandelten Tieren leicht. Die Gabe von hoch dosiertem TPO beeinflusste die mikrovaskulären Perfusionsausfälle nicht. 18 % der Sinusoide waren in dieser Gruppe nicht perfundiert.

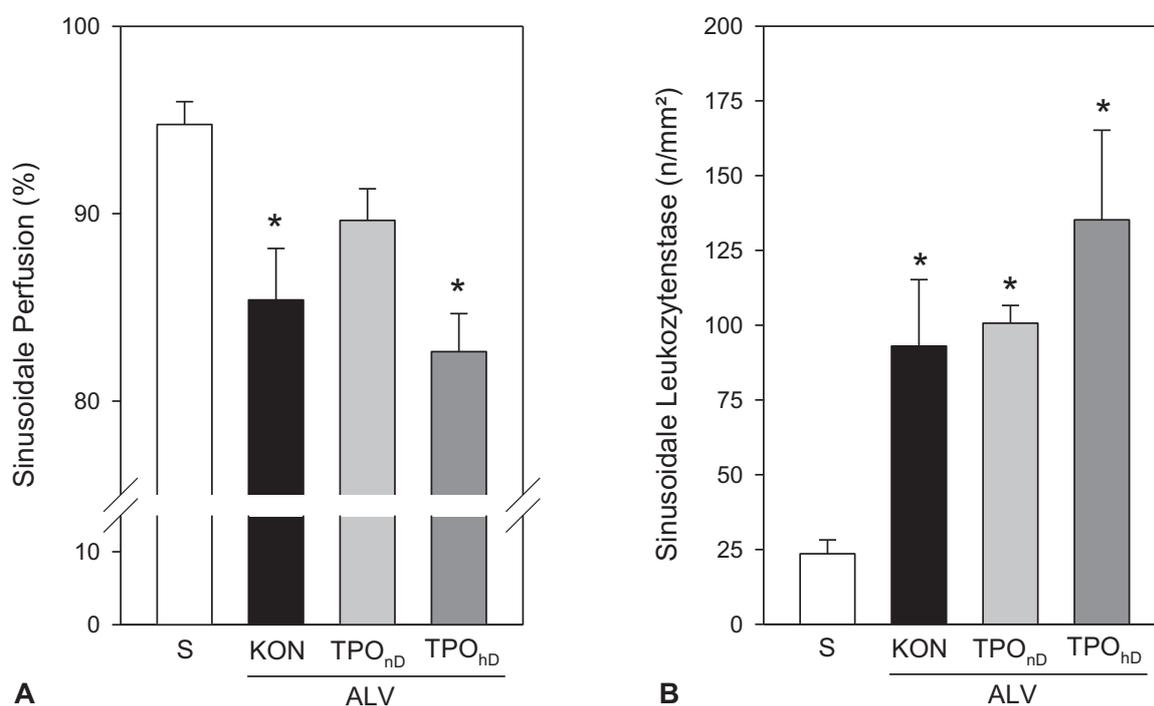


Abb. 10: Quantitative Analysen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. (A) Sinusoidale Perfusion und (B) sinusoidale Leukozytenstase jeweils 6 h nach Injektion von GalN/LPS. 24 h zuvor sind die Gruppen TPO_{nD}-ALV und TPO_{hD}-ALV mit 12,5 µg TPO (niedrige Dosis) bzw. 75 µg TPO (hohe Dosis) prämediziert worden. KON-ALV-Tiere sind als GalN/LPS-Kontrollgruppe 24 h zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung prämediziert worden. S (Sham) Tiere dienten als gesunde Kontrollgruppe. Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. S.

6.1.2 Leukozytenstase

Die GalN/LPS-Gabe löste eine massive inflammatorische Antwort in der Leber aus. So ergaben quantitative Analysen der Leukozytenstase (Abb. 11 B) signifikante Unterschiede zwischen allen mit GalN/LPS behandelten Gruppen und der gesunden Sham-Gruppe. Die Anzahl stagnierender Leukozyten nahm um knapp 300 % in der KON-ALV-Gruppe zu. Die vorherige Behandlung mit der niedrigen Dosis TPO beeinflusste diesen starken Anstieg nicht. Dagegen führte die Prämedikation mit der hohen Dosis TPO sogar zu einer weiteren Zunahme der Anzahl intrahepatisch adhärenter Leukozyten.

6.1.3 Hepatozelluläre Apoptose

Die Beurteilung der hepatozellulären Apoptose konnte nicht, wie in der Literatur mittels Bisbenzimid beschrieben, umgesetzt werden. Die Anfärbung der DNA-Doppelstränge der Hepatozyten mit Bisbenzimid ließ sich nur bei wenigen Tieren umsetzen. Die Auswertung der Anzahl apoptotischer Hepatozyten pro Gesichtsfeld zeigte lediglich eine Signifikanz zwischen der Sham-Gruppe und der TPO_{HD}-ALV-Gruppe (Ergebnisse nicht dargestellt). Um die zentrale Frage der hepatozellulären Apoptose genauer zu untersuchen, wurden ergänzende Western-Blot Analysen und immunhistochemische Färbungen der cleaved Caspase-3 durchgeführt. Die Ergebnisse sind weiter unten dargestellt.

6.2 Blut- und Plasmaanalysen

6.2.1 Blutbild

Gruppen	RBC (x 10 ¹² /l)	HKT (%)	WBC (x 10 ⁹ /l)	PLT (x 10 ⁹ /l)
S	8,9 ± 0,2	0,47 ± 0,02	4,3 ± 0,3	820 ± 83
KON-ALV	9,8 ± 0,2	0,53 ± 0,01	1,9 ± 0,5 *	746 ± 106
TPO _{nD} -ALV	8,7 ± 0,4	0,47 ± 0,02	1,8 ± 0,2 *	653 ± 79
TPO _{hD} -ALV	8,0 ± 0,6 #	0,44 ± 0,03 #	2,6 ± 0,5	486 ± 100

Tab. 4: Blutbildanalysen mit Erfassung der Erythrozytenzahl (RBC), des Hämatokritwerts (HKT), der Leukozytenzahl (WBC) und der Thrombozytenzahl (PLT) jeweils 6 h nach Injektion von GalN/LPS. 24 h zuvor sind die Gruppen TPO_{nD}-ALV und TPO_{hD}-ALV mit 12,5 µg TPO (niedrige Dosis) bzw. 75 µg TPO (hohe Dosis) prämediziert worden. KON-ALV-Tiere sind als GalN/LPS-Kontrollgruppe 24 h zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung prämediziert worden. S (Sham) Tiere dienten als gesunde Kontrollgruppe. Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. S. # $p < 0,05$ vs. KON-ALV.

Die Erythrozytenzahlen und der Hämatokrit-Wert variierten zwischen den vier Gruppen innerhalb der physiologischen Grenzwerte. Die Gabe von GalN/LPS führte zu einer ausgeprägten Leukozytopenie: die Anzahl zirkulierender Leukozyten sank im Durchschnitt um 50 %. Ein etwas geringerer Abfall war in der TPO_{hD}-ALV-Gruppe zu beobachten. Die Applikation von GalN/LPS führte zu keiner Abnahme der Thrombozyten im Vergleich zur gesunden Sham-Gruppe. Die Prämedikation mit TPO verursachte aber in steigender Dosis erstaunlicherweise einen deutlichen Abfall der Thrombozytenzahl.

6.2.2 Transaminasen

Um die Integrität der Hepatozyten zu quantifizieren, wurde eine Analyse der Transaminasen durchgeführt. Die GalN/LPS-Gabe löste eine massive zytoplasmatische wie auch mitochondriale Schädigung der Leber aus. Die Plasmaaktivitäten von AST, ALT und GLDH zeigten gegenüber der gesunden Sham-Gruppe einen bis zu 30-fachen Anstieg an (Abb. 11). Zu beobachten war ein besonders ausgeprägter Anstieg der Transaminasenkonzentration in der Gruppe, die

eine Prämedikation mit TPO in hoher Dosierung erhalten hatte, wohingegen die Gabe von TPO in niedriger Dosierung den Anstieg der Transaminasenaktivitäten im Vergleich zu mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten KON-ALV-Gruppe kaum beeinflusste.

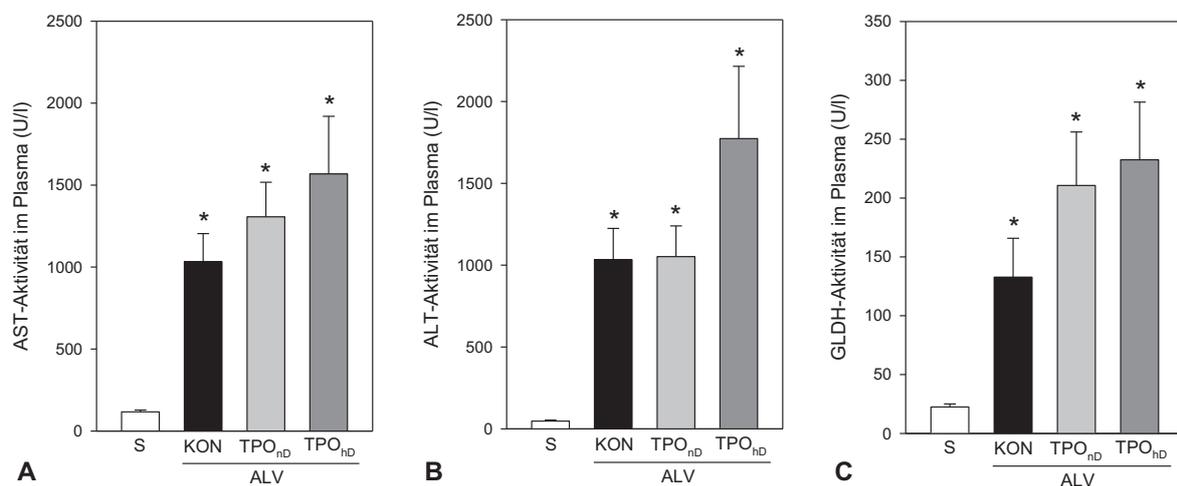


Abb. 11: Spektrophotometrische Analysen der leberspezifischen Enzyme (A) AST (Aspartataminotransferase), (B) ALT (Alaninaminotransferase) und (C) GLDH (Glutamatdehydrogenase) jeweils 6 h nach Injektion von GalN/LPS. 24 h zuvor sind die Gruppen TPO_{nd}-ALV und TPO_{hd}-ALV mit 12,5 µg TPO (niedrige Dosis) bzw. 75 µg TPO (hohe Dosis) prämediziert worden. KON-ALV-Tiere sind als GalN/LPS-Kontrollgruppe 24 h zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung prämediziert worden. S (Sham) Tiere dienen als gesunde Kontrollgruppe. Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. S.

6.2.3 Proinflammatorische Zytokine

Die systemischen Aktivitäten der proinflammatorischen Enzyme TNF- α und IL-6 wurden mit Hilfe eines *ELISA-Kits* und dem *Protein-Array-System* quantitativ analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

TNF- α stellt einen Marker dar, der besonders in der frühen Entzündungsphase gebildet wird. Die GalN/LPS-Gabe führte im Vergleich zur gesunden Sham-Gruppe nur zu einem sehr geringen Anstieg. Die Gabe von hoch dosiertem TPO zeigte eine ähnliche Zunahme der TNF- α -Konzentration wie die Gabe von GalN/LPS allein. Hervorzuheben ist der etwa 3-fache Anstieg von TNF- α nach der Prämedikation mit niedrig dosiertem TPO (Abb. 12 A).

Bemerkenswert waren die Unterschiede der IL-6 Plasmaaktivitäten zwischen den einzelnen Gruppen: gesunde Sham-Tiere wiesen eine sehr niedrige IL-6 Aktivität auf. Die Gabe von GalN/LPS löste eine ausgeprägte inflammatorische Antwort aus. Die IL-6-Aktivität verzehnfachte sich. Diese Antwort war auch nach Prämedikation mit niedrig dosiertem TPO zu beobachten. Konträr dazu zeigte sich nach Applikation mit hoch dosiertem TPO eine deutlich abgeschwächte, nahezu der gesunden Sham-Gruppe entsprechende IL-6-Aktivität (Abb.12 B).

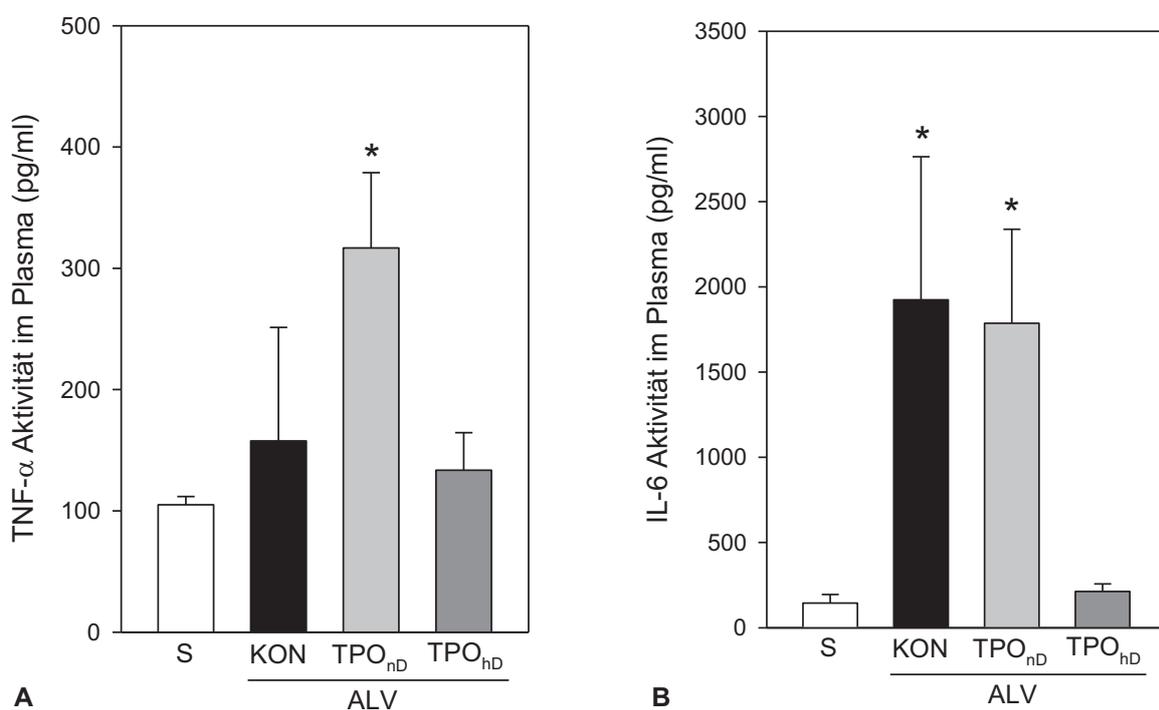


Abb. 12: Plasmaanalysen der proinflammatorischen Enzyme TNF- α (A) und IL-6 (B) jeweils 6 h nach Injektion von GalN/LPS. 24 h zuvor sind die Gruppen TPO_{nd}-ALV und TPO_{hd}-ALV mit 12,5 μ g TPO (niedrige Dosis) bzw. 75 μ g TPO (hohe Dosis) prämediziert worden. KON-ALV-Tiere sind als GalN/LPS Kontrollgruppe 24 h zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung prämediziert worden. S (Sham) Tiere dienen als gesunde Kontrollgruppe. Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. S.

6.3 Histologie und Immunhistochemie

6.3.1 Thrombopoetin-Rezeptor

Die immunhistochemische Färbung des TPO-Rezeptors im Lebergewebe von gesunden Sham-Tieren zeigte eine Färbung von nicht-parenchymatösen sinusoidalen Endothelzellen. Eine Färbung der Hepatozyten wurde nicht beobachtet.

Durch das induzierte septische Leberversagen wurde der TPO-Rezeptor vorwiegend im Zytoplasma von Hepatozyten hochreguliert (Abb. 13). Nach Prämedikation mit der niedrigen TPO-Dosierung zeigte sich eine geringere Rezeptorexpression. Diese Beobachtung konnte nicht nach Applikation einer hohen TPO-Dosierung gemacht werden: In dieser Gruppe zeigte sich eine fast verdoppelte TPO-Rezeptorexpression im Vergleich zur KON-ALV-Gruppe.

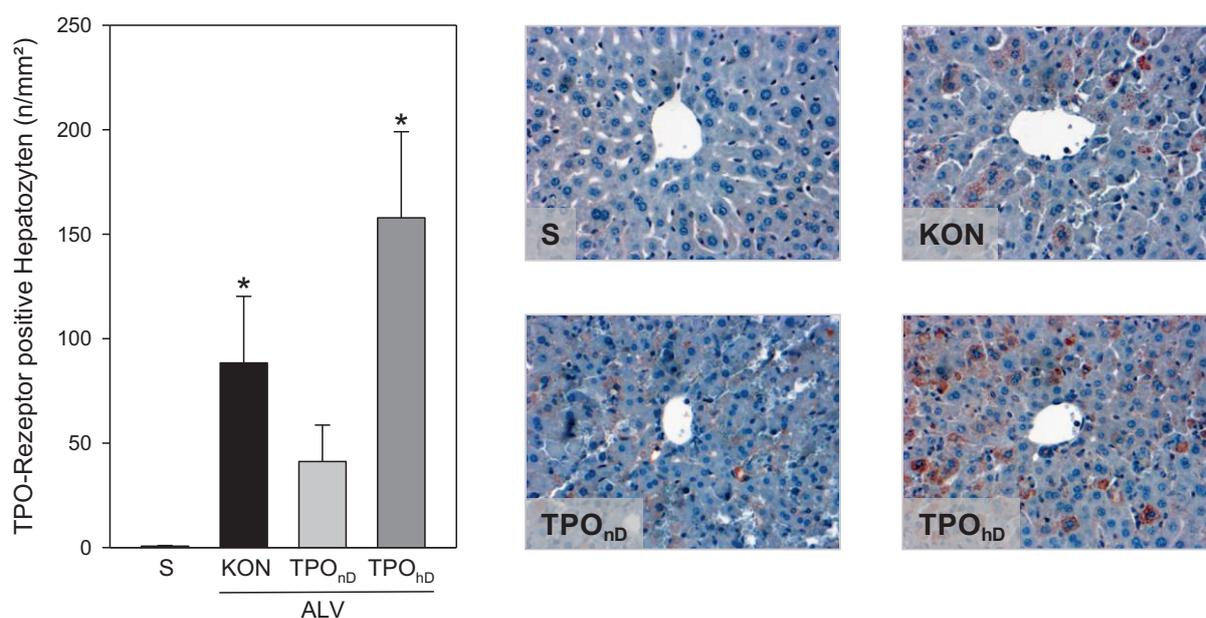


Abb. 13: Quantitative immunhistochemische Analysen der TPO-Rezeptor-Expression auf Hepatozyten (links) und entsprechend repräsentative Bilder (rechts) der vier Gruppen jeweils 6 h nach Injektion von GalN/LPS. 24 h zuvor sind die Gruppen TPO_{nD}-ALV und TPO_{hD}-ALV mit 12,5 µg TPO (niedrige Dosis) bzw. 75 µg TPO (hohe Dosis) prämediziert worden. KON-ALV-Tiere sind als GalN/LPS Kontrollgruppe 24 h zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung prämediziert worden. S (Sham) Tiere dienen als gesunde Kontrollgruppe. Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * p < 0,05 vs. S.

6.3.2 Cleaved Caspase-3

Die immunhistochemischen Färbungen der cleaved Caspase-3 zeigten in der gesunden Sham-Gruppe wenige apoptotische Hepatozyten. Dagegen konnte ein deutlicher hepatozellulärer apoptotischer Zelltod im Lebergewebe von GalN/LPS-behandelten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 14). Beim Vergleich der drei mit GalN/LPS-behandelten Gruppen konnte eine reduzierte Anzahl apoptotischer Hepatozyten in der TPO_{hD}-ALV-Gruppe beobachtet werden, welche jedoch nicht signifikant war.

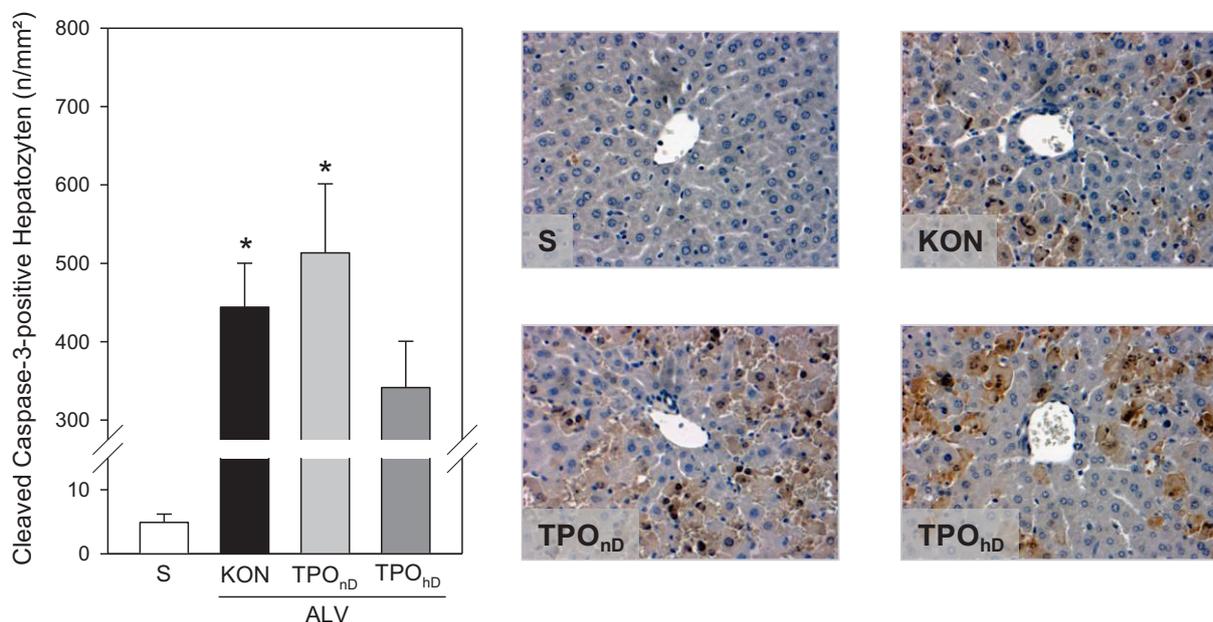


Abb. 14: Quantitative immunohistochemische Analysen der cleaved Caspase-3 positiven Hepatozyten (links) mit entsprechend repräsentativen Bildern (rechts) in den vier Gruppen jeweils 6 h nach Injektion von GalN/LPS. 24 h zuvor sind die Gruppen TPO_{nD}-ALV und TPO_{hD}-ALV mit 12,5 µg TPO (niedrige Dosis) bzw. 75 µg TPO (hohe Dosis) prämediziert worden. KON-ALV-Tiere sind als GalN/LPS Kontrollgruppe 24 h zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung prämediziert worden. S (Sham) Tiere dienen als gesunde Kontrollgruppe. Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. S.

6.4 Western-Blot Protein-Analyse

Die intravitalmikroskopisch mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid nachgewiesene hepatozelluläre Apoptose wurde mit Hilfe der Immunhistochemie von cleaved Caspase-3 quantifiziert. Diese Daten wurden durch den Proteinnachweis der

cleaved Caspase-3 mittels Western-Blot erweitert, um aussagekräftige Ergebnisse zum Ausmaß der Apoptose zu erhalten.

Die Western-Blot Analysen (Abb. 15) bestätigten, dass die Gabe von GalN/LPS zu einer massiven Apoptose im Vergleich zur gesunden Sham-Gruppe führte. Die vorherige Applikation von niedrig dosiertem TPO reduzierte die Proteinexpression der cleaved Caspase-3 im Vergleich zur KON-ALV-Gruppe gering. Durch hohe TPO-Dosen zeigte sich nahezu eine Halbierung der Protein-Expression. Diese Abnahmen waren jedoch nicht signifikant.

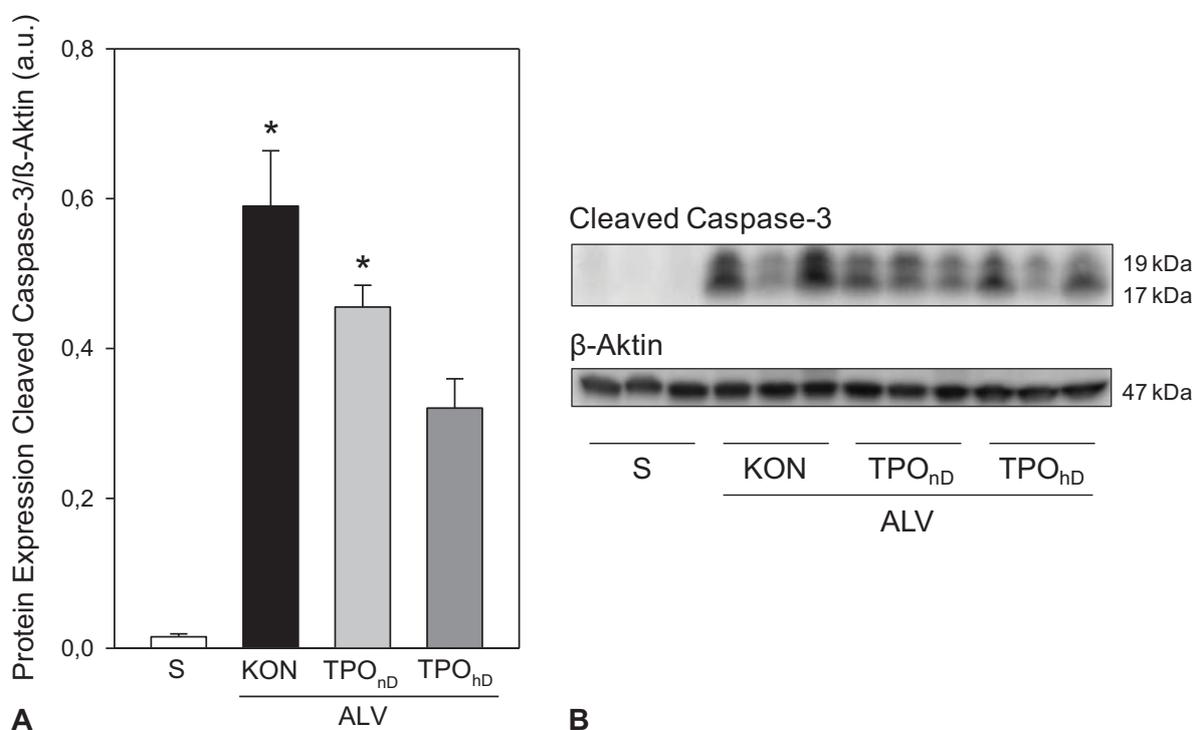


Abb. 15: (A) Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-3 (17/19 kDa) berechnet im Verhältnis zu β -Aktin (42 kDa) und (B) repräsentative Bilder der Western-Blot Analyse jeweils 6 h nach Injektion von GalN/LPS. 24 h zuvor sind die Gruppen TPO_{nD}-ALV und TPO_{hD}-ALV mit 12,5 μ g TPO (niedrige Dosis) bzw. 75 μ g TPO (hohe Dosis) prämediziert worden. KON-ALV-Tiere sind als GalN/LPS Kontrollgruppe 24 h zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung prämediziert worden. S (Sham) Tiere dienen als gesunde Kontrollgruppe. Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben; ANOVA und nachfolgender Paarvergleich; * $p < 0,05$ vs. S.

6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser tierexperimentellen Studie wurden mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie in vivo-Untersuchungen der Mikrozirkulation der Mausleber

durchgeführt. Nach Induktion eines ALV mittels GalN/LPS wurden die Effekte einer Prämedikation mit rekombinantem TPO in zwei unterschiedlichen Dosierungen untersucht. Um neben den in vivo Studien genauere Einblicke in die Mechanismen und das Ausmaß der Schädigung zu erhalten, wurden ergänzende hämatologische, biochemische, immunhistochemische und molekularbiochemische Parameter erhoben. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die Gabe von GalN/LPS führte zu einer massiven hepatozellulären Schädigung und einer schweren systemischen Inflammation. Dabei korrelierten die Ergebnisse der in vivo- mit denen der nachfolgenden ex vivo-Untersuchungen. Eine verminderte hepatische Perfusion, eine verstärkte Leukozytenakkumulation sowie eine hepatozelluläre Apoptose manifestierten sich in vivo. Laborchemisch zeigten sich erhöhte systemische Entzündungsparameter und Leberenzymkonzentrationen sowie reduzierte systemische Leukozytenzahlen. Diese schwere Schädigung spiegelte sich auch in einer verstärkten immunhistochemisch und molekularbiochemisch nachgewiesenen hepatozellulären Apoptose wieder.
2. Immunhistochemisch konnten wir nachweisen, dass der TPO-Rezeptor in der Leber exprimiert wird. Die Gabe von GalN/LPS führte insbesondere in den Hepatozyten zu einer verstärkten Expression des TPO-Rezeptors.
3. Die Gabe von TPO in zwei unterschiedlichen Dosierungen konnte das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung nicht wesentlich eindämmen. Die Applikation hoher TPO-Dosen verminderte die hepatozelluläre Apoptose zwar leicht und führte zu einer Senkung des systemischen IL-6-Spiegels, allerdings wurden gleichzeitig höhere Transaminasewerte gemessen und intravitalmikroskopisch eine eingeschränkte Perfusion und angestiegene Leukozytenakkumulation beobachtet.

7 DISKUSSION

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Tierexperimentelles Modell des akuten Leberversagens

Das akute Leberversagen ist fortwährend eines der herausforderndsten Krankheitsbilder auf der Intensivstation [42]. Die Überlebensraten haben sich in den vergangenen Jahrzehnten durch die moderne Intensivmedizin und die Möglichkeit zur Lebertransplantation verbessert. In den letzten Jahren stagnieren jedoch die Überlebensraten [2]. Tierexperimentelle Modelle sind ein Schlüssel, um die Pathophysiologie des Krankheitsbildes besser zu verstehen und damit die Grundlage zur Entwicklung wirkungsvoller Therapien zu legen. Die allgemeine Schwierigkeit eines experimentellen Tiermodells ist der unlösbare Widerspruch zwischen klinischer Realität und der experimentellen Vereinfachung [161]. Im Fall des akuten Leberversagens besteht die Schwierigkeit insbesondere darin, die zahlreichen Ätiologien und die klinischen Komplikationen in ein treffendes Tiermodell zu übertragen [162]. Weitgehend übereinstimmend wird die Frage beantwortet, wie das ideale Tiermodell des ALV aussehen müsste [162-165]: Neben der Reversibilität durch eine geeignete Therapie und der Reproduzierbarkeit sollte nach einer entsprechenden Zeit der Tod durch akutes Leberversagen eintreten. Außerdem muss die Größe des Tieres ausreichend sein, um genügend Blutproben gewinnen zu können. Darüber hinaus darf das Personal durch das Modell keinem Gesundheitsrisiko ausgesetzt werden.

Die etablierten tierexperimentellen Modelle zum ALV lassen sich in chirurgische, virale und chemische Modelle einteilen [165]. In den chirurgischen Modellen wird einzeln oder in Kombination die Hepatektomie und die Devaskularisation der Leber durchgeführt. Diese Modelle haben den großen Nachteil, dass sie nicht den inflammatorischen Status während des ALV widerspiegeln und stark vom chirurgischen Können abhängen [163].

Ein virales Modell hat sich lange Zeit nicht durchsetzen können. Im Jahr 2003 ist von Tenon et al. ein neues vielversprechendes Modell am Kaninchen eingeführt worden. Diese Kaninchen entwickeln nach Applikation eines *rabbit haemorrhagic disease virus* (RHDV) repräsentative biochemische und histologische Parameter und klinische Zeichen, die dem menschlichen ALV ähneln. Dieses Virus repliziert sich nicht in anderen Vertebraten, weshalb das Modell ausschließlich am Kaninchen angewendet werden kann [166].

In chemischen Modellen zum ALV werden verschiedene Hepatotoxine genutzt. Unter diesen haben sich hauptsächlich Acetaminophen und D-Galaktosamin durchgesetzt. Schwierigkeiten bereiten hier vor allem die Reproduzierbarkeit und die extrahepatische Toxizität [162]. Eine der Hauptursachen des ALV in der westlichen Welt ist die Acetaminophenintoxikation [5]. Wenn die physiologischen Abbauege von Acetaminophen im Leberparenchym gesättigt sind, wird Acetaminophen über das P-450-System abgebaut [167]. Dabei kommt es zur Bildung von toxischem N-Azetyl-p-Benzo-Quinon-Imin (NAPQI), dessen Toxizität zuerst noch durch den Radikalfänger Glutathion neutralisiert werden kann. Wenn die Glutathion-Reserven aufgebraucht sind, findet eine hepatozelluläre Nekrose statt [168]. Die Gabe von Acetaminophen im Tiermodell hat sich als nicht optimales Modell für das ALV herausgestellt, weil zum einen der Acetaminophen-Metabolismus abhängig von der Spezies und dem Alter ist [169] und zum anderen die Dosisfindung aufgrund von extrahepatozellulärer Toxizität schwer kalkulierbar ist [163, 170].

In den Versuchen für die hier vorliegende Arbeit wurde das chemische Modell D-Galaktosamin in Kombination mit Lipopolysaccharid genutzt. Dieses Modell des inflammatorischen ALV ist gut etabliert und wird in vielen Laboren angewendet [171]. Der Amino-Zucker D-Galaktosamin braucht organspezifisch hepatische Uridin-Nukleotide auf und bildet Uridin-Diphosphat-Hexosaminkomplexe [172]. Dadurch sinkt zwei Stunden nach der intravenösen Gabe von GalN die Proteinsynthese der Leber um 40 % [173]. Der Mausorganismus, der viel weniger sensitiv als der menschliche Organismus auf Lipopolysaccharid reagiert, wird durch GalN für die LPS-Gabe sensibilisiert [158]. So konnten Leist et al. beobachten, dass die

gemeinsame Gabe beider Stoffe zu einem massiven toxischen Anstieg des Zytokins TNF- α der Maus führt. Nach 5 h ist die Anzahl von Apoptosekörperchen in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe mit reiner GalN-Gabe signifikant erhöht. Die Anzahl von Nuklei mit Chromatin-Kondensation im Nukleus ist angestiegen und es wird eine milde, multifokale hepatozelluläre Nekrose beobachtet. Diese mündet nach 8 h in eine schwere hepatozelluläre Nekrose, eine massive Leukozyteninfiltration und eine Erythrozytenagglutination in der Leber. Die typische Leberarchitektur ist aufgehoben. Messungen der Transaminasen haben ergeben, dass der Anstieg der leberspezifischen Alaninaminotransferase am deutlichsten ausgeprägt ist. Dies lässt darauf schließen, dass ein selektiver hepatischer Schaden im Vordergrund steht, welcher letztendlich auch wesentlich für die Letalität des Modells verantwortlich ist.

Inwieweit entspricht dieses Modell den bereits einleitend genannten idealen Anforderungen an ein Tiermodell des ALV? Wie Studien in unserem Labor gezeigt haben, kann das durch GalN/LPS ausgelöste ALV durch z. B. Erythropoetin abgeschwächt werden [152]. Die Reversibilität ist somit in Teilen gegeben. Das ALV tritt nach einer gut definierbaren Zeitspanne auf, es entsteht durch pathophysiologisch bekannte Mechanismen wie z. B die Zytokinfreisetzung [171]. Die Reproduzierbarkeit ist somit bestätigt. Der Tod des Tieres tritt, wie durch Leist et al. (siehe oben) diskutiert, durch ein ALV ein. Die Größe des Tieres ist nicht ideal, da durch das limitierte Blutvolumen der Maus oft nicht genügend Proben gewonnen werden können. Beim sachgerechten Umgang mit den Chemikalien ist das Personal keiner Gesundheitsgefährdung ausgesetzt. Rahman & Hogdson merken an, dass das gewählte GalN/LPS-Modell nicht dem zeitlichen Verlauf des ALV beim Menschen entspricht, da das ALV innerhalb von 2 – 6 h rapide progressiv verläuft. Es sollte deswegen nur genutzt werden, um spezifische Aspekte des ALV zu untersuchen [174]. Dieses Argument ist richtig, es übersieht aber einen entscheidenden Vorteil des Modells: Sollte in einem letalen tierexperimentellen Modell ein wirkungsvoller therapeutischer Ansatz gefunden werden, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass dieser in meist moderateren Verläufen beim Menschen therapeutisch wirkungsvoll ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich das experimentelle GalN/LPS-Modell an der Maus trotz oben genannter Nachteile sehr gut eignet, um spezifisch den Einfluss von Thrombopoetin auf die hepatozelluläre Apoptose und die Inflammation zu untersuchen. Sinnvolle Alternativen stehen nicht zur Verfügung.

In dieser Studie ist GalN/LPS C57BL/6J-Mäusen gespritzt worden. Dieser Mausstamm ist ein Inzucht-Stamm, der im Jahr 1921 von C.C. Little mit einem Mauspaar aus Miss Abby's Lathrops Beständen in den USA entwickelt wurde. Mehr als 20 Mal sind Geschwisterpaare gekreuzt worden, bis eine genetische und phenotypische Uniformität erreicht worden ist. Dieser Stamm ist heute ein in der tierexperimentellen Forschung oft verwendeter Stamm und kommt unter anderem in der Onkologie [175], der Impfstoffentwicklung [176], der Immunologie [177], der Virologie [178], der Endokrinologie [179], der Pharmakologie [180], der Neurologie [181] und der Hämatologie zum Einsatz [182]. Im Zusammenhang mit dem GalN/LPS-Modell hat sich die C57BL/6J-Maus bereits in verschiedenen Forschungsgruppen bewährt [15, 152, 158, 173, 183-185] und ist somit ideal für diese Versuche geeignet.

7.1.2 Untersuchungstechniken

In dieser Arbeit wurde ein Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation beim ALV gerichtet. Mikrozirkulatorische in vivo Untersuchungen der Mausleber stellen aufgrund der anatomischen Gegebenheiten eine besondere Herausforderung dar. Die Leber wird sowohl über die Arteria hepatica als auch über die Vena portae versorgt. Das Fluss-Verhältnis der beiden Gefäße ist nicht konstant. Außerdem ist die Leber im Peritonealraum über Ligamenti fixiert. Die Leber besteht aus zahlreichen Lobuli und ist von einer feinen Kapsel aus Bindegewebe umgeben (Glisson-Kapsel). Die Leber liegt im rechten Oberbauch und ist mit ihrer Facies diaphragmatica größtenteils unter dem rechten Rippenbogen verborgen. Zur Beurteilung diente in dieser Arbeit die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als wichtigste Untersuchungstechnik.

Die intravitalmikroskopische Technik wurde bereits im Jahre 1948 von Knisely an Lebern von mit Plasmodium knowlesi infizierten Rhesus-Affen zu Untersuchungen des Blutflusses genutzt [186]. Weiterentwicklungen haben die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zu einer attraktiven Technologie gemacht, um mikrovaskuläre, zelluläre und molekulare Mechanismen verschiedenster Krankheitsbilder zu untersuchen [187]. In den letzten Jahrzehnten ist und wird die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in der experimentellen Forschung an verschiedenen Organen unter anderem zu Fragestellungen der Knochenheilung [188], der Tumorangiogenese [189], der Thrombose [190], der Arteriosklerose [191, 192], der Inflammation und Sepsis [152, 193-196], der Autoimmunpankreatitis [197], des Ischämie/Reperfusion-Schadens der Leber [198-200] und des ALV [15, 152, 201] erfolgreich eingesetzt.

Neben der Intravitalmikroskopie stehen alternative Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation verschiedenster Organe zur Verfügung, die hier kurz diskutiert werden sollen: Als Goldstandard zur Untersuchung der nutritiven Organperfusion wird die *microspheres*-Technik (MT) angesehen [16]. Diese Mikrokügelchen mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich sind radioaktiv markiert, gefärbt oder mit Fluoreszenzfarbstoffen besetzt [202, 203]. Eine bestimmte Anzahl dieser Mikropartikel wird der Maus in den linken Ventrikel gespritzt und verfängt sich abhängig von der kardialen Auswurfleistung im Gefäßbett der Organe nach der ersten Zirkulation. Nach postmortaler Entnahme wird der Organblutfluss zum Beispiel mit Hilfe automatischer Spektralanalysen berechnet. Die Methode ist sehr sensitiv. In der Leber kann allerdings nur der Blutfluss der Arteria hepatica berechnet werden [204]. Die Methode kann klinisch nicht angewendet werden und verlangt außerdem zwingend das Töten des Tieres direkt nach dem Experiment.

Echtzeitmessungen der mikrovaskulären hepatischen Erythrozyten-Perfusion gelingen mit der Laser-Doppler-Flussmessung (LDFM) [205]. Die Möglichkeiten kontinuierlich nicht-invasiv zu messen und die hohe räumliche Auflösung sind Vorteile dieser Methode [206]. Absolute Blutflussmessungen und die Eindringtiefe der Messung können nicht berechnet werden. Dazu variieren die

Ausgangsflusswerte zu sehr [200]. Beim Vergleich zwischen der Laser-Doppler-Flussmessung und der IVM konnten in den Parametern Erythrozytenfluss und sinusoidale Perfusion ähnliche Ergebnisse gewonnen werden [16].

Wie die Laser-Doppler-Flussmessung findet auch die Indozyaningrün (ICG)-Clearance als nicht invasives Verfahren tierexperimentelle und klinische Anwendung [207, 208]. Das Verfahren nutzt die hepatische Verschwinderate (*plasma-disappearance-rate*) von ICG [40] und kann daher genutzt werden, um die hepatische Perfusion zu ermitteln [209]. Die hepatische ICG-Aufnahme kann auch mittels transkutaner Pulsdensitometrie ermittelt werden. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der hepatischen ICG-Aufnahme-Rate einerseits und des hepatischen Blutflusses und der Mikrozirkulation andererseits [210]. Untersuchungen zur Leber-Mikrozirkulation an der Ratte zeigten jedoch, dass die ICG-Clearance im Vergleich zur direkten elektromagnetischen Messung an der A. hepatica und der V. portae nur 30 % des eigentlichen Blutflusses widerspiegeln [211].

Der Intravitalmikroskopie am ehesten vergleichbar ist die orthogonale Reflexspektrometrie (*orthogonal-polarized spectral-(OPS)-imaging*), da mit beiden Methoden direkte Aussagen in vivo über die Mikrozirkulation getroffen werden können. Bei dieser Methode ist die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen nicht möglich. Zur OPS-Darstellung wird eine Sonde auf das Gewebe gehalten, die linear polarisiertes Licht aussendet. Dieses Licht wird im Gewebe gestreut, teilweise reflektiert und vom Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert. Zwei orthogonal zueinander angeordnete Polarisationsfilter erzeugen ein Bild der Mikrozirkulation, die mit denen der Intravitalmikroskopie vergleichbar sind [212]. Mit Hilfe dieses innovativen portablen Mikroskops konnten erstmals Studien der Mikrozirkulation an Patienten intraoperativ an der Leber [213] und sublingual an septischen Patienten [214] durchgeführt werden. Durch die *sidestream-dark-field*-Technik wurde die OPS-Technik weiterentwickelt. LED-Dioden, die ringförmig an der Spitze der Sonde angebracht sind, liefern nun sowohl schärfere Bilder als auch Aufnahmen aus tieferen Ebenen. Reflexionen von der Oberfläche können durch die ringförmige

Anordnung der Dioden vermieden werden [215]. Es gelingt mit dieser Technik außerdem die Darstellung weißer Blutzellen [216].

Ein Teil der nichtinvasiven Techniken (LDFM, ICG-Clearance) bietet im Vergleich zu den invasiven Techniken den Vorteil, dass ein Tier mehrmals untersucht werden kann. Außerdem müssen die Tiere nicht laparotomiert werden, so dass die Tiere nicht auskühlen und die Hämodynamik nicht durch exogene Stimuli verfälscht werden kann. Die IVM der Mausleber setzt neben mikrochirurgischer Laparotomie ein Lösen der Leberbändchen mittels einer Schere voraus. Dabei wird die Leber vorsichtig mit in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Wattetupfern angehoben und auf eine aus Knete der Form der Leber angepasste Vorrichtung um 180° Grad aus dem Situs gedreht. Dies geschieht, weil die Unterfläche der Leber durch ihre plane Oberfläche besser intravitalmikroskopisch untersuchbar ist. Der Vorgang der Auslagerung der Leber ist mit dem Risiko verbunden, dass Perfusionsausfälle entstehen. Die Austrocknung der Leberoberfläche während der verschiedenen Aufnahmen stellt ebenfalls einen kritischen Punkt im Experiment dar. Diesem Problem wird begegnet, indem die mikroskopisch zu untersuchende Oberfläche mit einem Deckgläschen bedeckt und die restliche Leber mit einer in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Sauerstoff-impermeablen Folie abgedeckt wird. Um standardisiert zu arbeiten, wurden die Tiere streng nach derselben Prozedur operiert und untersucht. Die Prämedikation erfolgte verblindet. Neben den genannten Nachteilen ist der große Vorteil der IVM deren Vielfältigkeit, welche unter anderem durch eine Reihe von möglichen einsetzbaren Fluoreszenzfarbstoffen entsteht.

Frühe und späte mikrovaskuläre Perfusionsschäden der Leber werden, so wird angenommen, auf Ebene des individuellen Sinusoids ausgelöst [217]. Insofern ist die Untersuchung der mikrovaskulären Perfusion und speziell die Perfusion der Sinusoide vorrangiges Ziel der Untersuchung gewesen. Zu diesem Zwecke wurde das Fluorophor Natriumfluoreszein genutzt. Der intravasal anflutende Farbstoff diffundiert rasch in den Disse-Raum und das extravasale Gewebe, so dass die ungefärbten Erythrozyten den Intravasalraum schwarz erscheinen lassen und ein

negativer Kontrast entsteht [200]. Dies ist eine verlässliche Methode, um die Mikrozirkulation zu untersuchen [218].

Ein wichtiger weiterer Parameter, der mit der IVM untersucht wurde, ist die Rekrutierung von Leukozyten im Leberparenchym. Leukozyten tragen zur Entwicklung des ALV bei [15, 152, 219-221]. Der Farbstoff Rhodamin-6G ermöglicht die Färbung der Leukozyten, so dass deren Fließverhalten in den Sinusoiden beobachtet und quantifiziert werden konnte [200].

Der apoptotische Zelltod rückt in den Fokus der Forschung zur Pathophysiologie des ALV [61, 95, 222-224]. Apoptose wird als Auslöser für die Intensivierung der inflammatorischen Antwort in der Leber angesehen [225]. Neue Entwicklungen erlauben den Einsatz von Bisbenzimid in der Intravitalmikroskopie [226, 227]. Dieses Fluorophor färbt die DNA an [228, 229]. Charakteristische Zeichen der Apoptose wie Kondensation, Fragmentation und Margination des Kern-Chromatins lassen sich quantitativ erfassen. Um den apoptotischen Zelltod zu untersuchen, wurde den Mäusen der fluorophore Farbstoff intravenös injiziert. Die von El-Gibaly und Schäfer beschriebenen Möglichkeiten, das Ausmaß des apoptotischen Zelltodes mit Hilfe von Bisbenzimid zu quantifizieren, erwiesen sich in unserer Arbeit als nur bedingt aussagekräftig. Die DNA von Leberparenchymzellen ließ sich zum Teil anfärben, eine eindeutige Quantifizierung apoptotisch veränderter Hepatozyten war jedoch nicht möglich.

Die durch Fluoreszenzfarbstoffe möglichen, oben beschriebenen Untersuchungen mit Hilfe der IVM bieten andere oben beschriebene Techniken nicht, weshalb Vollmar und Menger wie folgt urteilen: „Die IVM ist die idealste Technik, um 1) komplexe biologische Interaktionen und dynamische hepatische Krankheitsmechanismen zu analysieren und 2) neue prophylaktische und therapeutische Ansätze gezielt für Störungen der Mikrozirkulation und mikrovaskuläre Pathologien bei Erkrankungen der Leber zu entwickeln und zu testen“ [16].

Hepatozyten reagieren auf unterschiedliche Stressfaktoren besonders ausgeprägt mit Apoptose [223, 224]. Eindeutig lässt sich die Apoptose nur in vivo untersuchen [230]. Um die intravitalmikroskopischen Erkenntnisse zum hepatozellulären apoptotischen Zelltod auch ex vivo genau zu evaluieren, wurden ergänzende Untersuchungen mittels der cleaved Caspase-3-Immunhistochemie und der cleaved Caspase-3 Western-Blot Proteinanalyse durchgeführt.

Zur Beurteilung der hepatozellulären Integrität werden die Transaminasen ALT und AST sowie GLDH im Plasma bestimmt. Eine ALT-Freisetzung zeigt hoch sensitiv und gut spezifisch eine hepatozelluläre Schädigung an [231]. Der Nachweis von AST ist weniger spezifisch, da die Konzentration ebenfalls bei Gewebeschäden anderer Organen erhöht sein kann. Die hepatische Apoptose und die massive Inflammation führen letztendlich zur Leberzellnekrose [232]. In der Detektion von hepatischer Nekrose und Pränekrose hat sich GLDH als Biomarker an der Ratte bewährt [233], weshalb GLDH hier ebenfalls bestimmt wurde.

Während des ALV gelangen proinflammatorische Marker, darunter TNF- α und IL-6, in das Plasma [234]. TNF- α spielt eine Schlüsselrolle während der hepatozellulären Schädigung, da es durch seine pleiotropen Eigenschaften verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt [235]. Durch IL-6 können neben Aussagen zur Proinflammation unter anderem auch Aussagen zur Hypoxie und Gewebeschädigung getroffen werden, da es auch von Fibroblasten und Endothelzellen unter Sauerstoffmangel sezerniert wird [236]. Die Konzentration dieser beiden Zytokine wurde in der Studie bestimmt, um das antiinflammatorische Potential von TPO und mögliche Änderungen der hepatischen Mikrozirkulation und Apoptose in Bezug auf die systemische Entzündungsreaktion zu untersuchen.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die exogene Administration von TPO den durch GalN/LPS gesetzten endotoxämischen Leberschaden trotz der Hochregulation des TPO-Rezeptors in der Leber nicht abmildern konnte und die Gabe hoher TPO-Dosen wahrscheinlich sogar einen toxischen Effekt besitzt.

7.2.1 Expression des Thrombopoetin-Rezeptors

Die rezeptorbindende Domäne von TPO zeigt 20 % Gleichheit und 25 % Ähnlichkeit mit EPO [123]. De Sauvage et al. sprechen sogar von noch größerer struktureller Übereinstimmung der beiden Wachstumsfaktoren [237]. Der TPO-Rezeptor c-mpl gehört zur homodimeren Typ-1-Zytokin-Rezeptor-Subfamilie, der unter anderem die Rezeptoren für EPO, für den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor und für Prolaktin zugeordnet werden [238]. Die Signalweitergabe der Rezeptoren dieser Subfamilie ist mit Mitgliedern der zytoplasmatischen nicht-Rezeptor-Janus-Kinasen-(JAKs)-Familie assoziiert [239].

EPO wird als Mediator der normalen physiologischen Antwort auf Hypoxie in der adulten Niere und der Leber exprimiert [240]. EPO besitzt eine beeindruckende Protektion gegen akute ischämische Schäden [241]. Es präkonditioniert (ischämische Toleranz) und limitiert das destruktive Potential von TNF- α und anderen proinflammatorischen Zytokinen in verschiedenen Organen [242]. Darunter ist auch die protektive Wirkung im septischen [152] und nicht-septischen Leberschaden [243] zu nennen. Eine Reihe von aktuellen Studien schlägt vor, dass die Expression des EPO-Rezeptors in verschiedenen nicht-hämatopoetischen Zellen und das endogene EPO/EPO-R-System über verschiedene Signalkaskaden zur Immunantwort des Körpers auf exogen schädliche Stimuli beitragen [119, 151]. EPO und der EPO-Rezeptor werden unter anderem im Endothel verschiedener Gewebe exprimiert [244]. Im hypoxischen Zustand, z. B. im Rahmen einer mikrozirkulatorischen Störung, stimuliert EPO massiv die Expression des EPO-R [245]. Diese Expression führte an der Blut-Hirn-Schranke zur Ausbildung von tight junctions in vitro [246].

In der Leber ist die Integrität der sinusoidalen Endothelschranke für die Leberfunktion und das Gleichgewicht der Oxidantien entscheidend [25]. Im Rahmen einer akuten inflammatorischen Gewebeschädigung werden Matrixmetalloproteinasen auf Sinusendothelzellen aktiviert, wodurch Lücken gebildet werden. Dadurch kommen neutrophile Zellen mit geschädigten Hepatozyten in Kontakt [27]. Dies führt zu einer oxidativen Zerstörung der Hepatozyten [221]. Wir konnten Ergebnisse früherer

Studien bestätigen, dass c-mpl auf SEZ exprimiert wird [247, 248]. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass der dem EPO-R chemisch ähnlich strukturierte c-mpl-Rezeptor in der Leber während des inflammatorischen akuten Leberversagens verstärkt exprimiert wird. Dies geschieht an einer für die Leberfunktion entscheidenden Stelle: dem sinusoidalen Endothel. Cardier et al. konnten in vitro nachweisen, dass exogen appliziertes TPO über seinen Rezeptor das Wachstum von diesen sinusoidalen Endothelzellen stimuliert. Sie vermuteten, dass die Aktivierung des c-mpl-Rezeptors durch hohe TPO-Spiegel im Blut, wie sie zum Beispiel während der Leberregeneration zu beobachten sind, das Wachstum der hepatischen SEZ stimulieren könne. Sie folgerten, dass dadurch der Aktivierung des c-mpl-Rezeptors eine Bedeutung bei den Reperaturmechanismen der SEZ zu Teil werde [247].

Neben der Expression auf Endothelzellen konnte eine Hochregulation des TPO-Rezeptors direkt an den für die mannigfachen Funktionen der Leber verantwortlichen Hepatozyten beim ALV beobachtet werden. Bisher geht man davon aus, dass die Leber Hauptbildungsort der TPO-Produktion ist. Bei Patienten mit einem Leberversagen sind niedrige TPO-Plasma-Spiegel gemessen worden. Nach erfolgreicher Lebertransplantation sind die TPO-Plasma-Spiegel wieder auf normale Werte angestiegen [249, 250]. Versuche anderer Gruppen haben ergeben, dass die TPO-Transkription und TPO-Translation in der Leber konstant sind und dass die Konzentration des zirkulierenden TPO direkt von der Anzahl zirkulierender Plättchen abzuhängen scheint. Diese eliminieren das TPO durch Bindung an ihre Rezeptoren aus dem Plasma. Im Falle einer Thrombozytopenie wird wenig TPO durch die Thrombozyten metabolisiert und die hohe Plasma-TPO-Konzentration stimuliert das Knochenmark, um die Bildung neuer Thrombozyten zu stimulieren [251, 252]. Das dies nicht der einzige Regulationmechanismus ist, scheint eine Studie von Zakyntinos et al. zu zeigen: septische Patienten mit konstanter Thrombozytenzahl wiesen erhöhte TPO-Plasma-Spiegel auf. Hingegen haben Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock bei niedrigen im Blut zirkulierenden Thrombozytenzahlen stark erhöhte TPO-Plasma-Spiegel [253]. Der vielfach postulierte oben beschriebene Regulationsmechanismus kann für die erhöhten TPO-Plasma-Spiegel in septischen Patienten nicht verantwortlich sein. Der Nachweis des

c-mpl Rezeptors auf Hepatozyten während der Inflammation könnte ein Hinweis auf einen bisher unbekanntem Regulationsmechanismus sein. Dies müsste in anschließenden Studien näher untersucht werden.

7.2.2 Effekte von Thrombopoetin im akuten Leberversagen

7.2.2.1 Systemische Parameter

Die Leukozytopenie ist ein Kriterium zur Diagnose eines *systemic inflammatory response syndrom*. Die Thrombozytopenie ist ein Hinweis auf eine disseminierte intravasale Gerinnung in der schweren Sepsis. Vollmar et al. stellten in einem Endotoxinmodell an der Ratte fest, dass bereits 1 h nach der Gabe von Endotoxin die Leukozytenzahl im Blut vermindert ist [196]. Der Verlust von Immuneffektorzellen hindert das Immunsystem, den auslösenden Infektionsherd effektiv zu bekämpfen [99]. Wie einleitend erwähnt, gerät während der Inflammation das Gerinnungssystem aus dem Gleichgewicht. Dies führt zur Aktivierung und zum Verbrauch von Thrombozyten. Mikrothrombosen mit Störungen der Mikrozirkulation sind die Folge [254]. In dieser Studie konnten wir sehen, dass die Gabe von GalN/LPS unabhängig von der TPO-Gabe und -Dosierung eine Leukozytopenie zur Folge hat. Dies deutet darauf hin, dass TPO keinen Einfluss auf den Verlust von Immuneffektorzellen besitzt. Eine leichte, nicht signifikante Thrombozytopenie ist nur in der TPO_{HD}-Gruppe gemessen worden. Eventuell verstärken hohe Konzentrationen von TPO die Aktivierung des Gerinnungssystems.

7.2.2.2 Mikrozirkulation und Inflammation

Die Leber spielt eine Schlüsselrolle in multiplen regulatorischen Aspekten der Wirt-Abwehr während der Sepsis. Ein Perfusionsschaden in der Leber aggraviert früh die Folgen einer Sepsis [255]. Jüngst berichteten Kortgen et al. über eine subklinische Leberschädigung bei septischen Patienten [36]. Bisher nur im Tierexperiment nachgewiesene mikrozirkulatorische Veränderungen, die Sequestration von Leukozyten und die Aktivierung von Plättchen werden dafür verantwortlich gemacht [256, 257]. Eine Verminderung im mikrovaskulären Blutfluss der Leber wird zunehmend als wichtige Ursache für das Sepsis-induzierte MOV angesehen [258].

Das ALV ist als ein Syndrom mit einem Versagen der Zirkulation charakterisiert und ist damit in vielerlei Hinsicht dem septischen Schock sehr ähnlich [259].

Die Mikrozirkulation der Leber stellt die Versorgung des parenchymatösen Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher, dient als Eintrittspforte für Leukozyten während der hepatischen Inflammation und ist verantwortlich für die Clearance von toxischen Stoffen und Fremdkörpern aus dem Intravasalraum [16]. Ein komplexes Zusammenspiel aus sinusoidaler Endothelzellaktivierung, sinusoidaler Vasomotorendysfunktion, sinusoidaler Perfusionseinschränkung und hypoxischem Zelltod bedingt einen mikrozirkulatorischen Zusammenbruch. Dieser wird bei unterschiedlichen Ätiologien von Leberdysfunktionen beobachtet, die allesamt in einem ALV enden können. Dazu zählen der Leberschaden durch Ischämie/Reperfusion [200], hämorrhagischen Schock [260, 261] und Sepsis/Endotoxämie [22, 201, 256, 262]. Wir konnten Studien aus unserem Labor bestätigen, dass 6 h nach GalN/LPS-Gabe Einschränkungen der sinusoidalen Perfusion bestehen. Die sinusoidale Perfusion konnte durch die Prämedikation mit niedrig und hoch dosiertem rekombinantem TPO nicht beeinflusst werden [15, 152].

Die Leberdysfunktion und der hepatozelluläre Schaden durch neutrophile Zellen ist in verschiedenen experimentellen Modellen beobachtet worden: hepatischer Ischämie/Reperfusion-Schaden [263], endotoxämischer Schock [264], Sepsis [265], alkoholische Hepatitis [266], obstruktive Cholestase [267], *remote-organ*-Trauma [268], und Concanavalin A- oder α -Naphthylisothiocyanat-induzierte Leberverletzung [269, 270]. Die Leukozytenakkumulation wird durch folgende Faktoren gesteuert: die Schwellung von Endothel- und Kupfferzellen, die verminderten rheologischen Eigenschaften von Leukozyten [271] und die Expression von ICAM-1 und *vascular-adhesion-molecule-1* (VACM-1) [272-275]. In einer tierexperimentellen Studie aus unserem Labor konnte eine verminderte hepatische Leukozytenadhäsion signifikant mit einem abgeschwächten Leberschaden in Verbindung gebracht werden [152]. In der hier vorgelegten Studie konnte die Gabe von TPO keine verminderte Leukozytenstase bewirken. Dies bedeutet, dass TPO höchstwahrscheinlich keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die oben genannten steuernden Faktoren der

Leukozytenakkumulation hat. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Parametern dieser Studie.

Eine Inflammation entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel von Zellen des Immunsystems. Diverse Signalprozesse sind nötig, um eine effektive Immunantwort zu erreichen. Die Art der Immunantwort in diesem Netzwerk wird unter anderem durch die Zytokine gesteuert [276, 277]. IL-6 und TNF- α wirken dabei vorwiegend proinflammatorisch [278]. Wird eine massive inflammatorische Antwort in der Leber ausgelöst, kann ein Teufelskreis entstehen, der in ein akutes Leberversagen münden kann.

Unter den proinflammatorischen Zytokinen spielt TNF- α eine zentrale Rolle, weil es pleiotrope biologische Effekte besitzt. Diese hängen mit der Eigenschaft zusammen verschiedene intrazelluläre Signalwege initiieren zu können [235]. Es besitzt die Fähigkeit die Apoptose zu regulieren, worauf im Verlauf noch näher eingegangen wird, sowie die Eigenschaft die Inflammation zu steuern. Essani et al. vermuten, dass TNF- α ein Hauptmediator bei der Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 ist und damit die wesentliche Grundlage für die durch Neutrophile induzierte Leberzell dysfunktion legt [279]. Dadurch kommt TNF- α eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des ALV in verschiedenen Tiermodellen zum Leberschaden zu [158, 173, 280]. Kupfferzellen (KZ) spielen hierbei, wie einleitend bereits dargestellt, eine zentrale Rolle. Die Transkription von TNF- α -mRNA wird in den KZ nach einer Aktivierung durch LPS hochreguliert. Dies hat eine verstärkte Freisetzung von TNF- α in das Plasma zur Folge [11]. Die Plasmaspiegel von TNF- α korrelieren in einer Reihe von Tiermodellen zum Leberschaden mit dem hepatozellulären Schaden [15, 152, 281, 282]. Le Minh et al. untersuchten in einem Modell des GalN/LPS-induzierten Leberschadens die Plasma-Konzentrationen von TNF- α jeweils 2 h, 4 h und 6 h nach Gabe von GalN/LPS. Sie stellten die höchste Plasma-Konzentration nach 2 h fest. Im Anschluss fiel die Konzentration um etwa 2/3 ab [152]. In der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied der TNF- α -Plasma-Konzentrationen zwischen der gesunden Kontrollgruppe (Sham) und der KON-ALV-Gruppe. Dies liegt sehr wahrscheinlich am Zeitpunkt der Blut-Abnahme: Die Plasma-

Konzentrationen sind bei diesem frühen akute-Phase-Protein bereits gesunken. In diesem Zusammenhang verwundert die hohe Plasma-Konzentration von TNF- α in der TPO_{ND}-ALV-Gruppe. Um diesen Anstieg adäquat diskutieren zu können, wären Messungen zum Verlauf der TNF- α -Konzentration in diesen Versuchsgruppen im Rahmen des ALV erforderlich gewesen.

Der Freisetzung von TNF- α aus den KZ während der Inflammation folgt die Sekretion von IL-1 und IL-6 [17]. Beide Zytokine entfalten neben der proinflammatorischen Wirkung und der Steuerung der Akute-Phase-Reaktion eine massive Induktion der Koagulation [94]. IL-6 ist wie TNF- α eine pleiotrope Substanz und löst über die Induktion der ACTH-Synthese auch anti-inflammatorische Effekte aus [283]. Das Zytokin spielt auch im nicht-septischen Schock eine Rolle [284]. IL-6-knockout-Mäuse leiden an einer verminderten Leberregenerationsfähigkeit, die durch die Gabe von IL-6 aufgehoben werden kann [285]. IL-6 scheint somit wesentlich an der Induktion der Leberregeneration beteiligt zu sein [222, 286]. In einem Modell des akuten septischen Leberversagens an der Maus konnte die Gabe von Hyper-IL-6 den gesetzten Leberschaden abschwächen und die Letalität senken [287]. Hyper-IL-6 ist ein IL-6-agonistisches, hoch potent wirkendes Protein [288]. Abschließend geklärt ist die Rolle von IL-6 in der Leberregeneration nicht. Es wird beispielsweise diskutiert, dass EPO seine protektiven Eigenschaften in Teilen durch die Reduktion der Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Plasma, inklusive IL-6 entfaltet [152, 289-291]. Diese Erkenntnisse stehen mit weiter oben beschriebenen, von Arbeitsgruppen um Hecht und Peters postulierten proregenerativen Eigenschaften von IL-6 im Widerspruch.

Einen deutlichen Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration nach GalN/LPS-Applikation beobachteten wir in der Kontrollgruppe. Niedrig dosiertes TPO zeigte keinen Einfluss auf diesen Anstieg. Die Gabe von hoch dosiertem TPO führte interessanterweise zu einer Inhibition dieses Anstiegs. Über den Grund für diese Inhibition können wir derzeit nur spekulieren. Die Plasmakonzentration von TPO ist invers abhängig von der Anzahl der zirkulierenden Plättchen im Blut, die wahrscheinlich über Bindung, Internalisation und Degradierung von TPO über den TPO-Rezeptor c-mpl auf

Plättchen und ihren Vorläuferzellen geregelt wird [292]. Diese inverse Beziehung konnte bei Patienten mit ALV nicht beobachtet werden [293]. Dies könnte mit dem wechselseitigen Zusammenhang zwischen IL-6 und TPO zusammenhängen. IL-6 kann die mRNA-Level und die Sekretion von TPO in humanen Hepatomazellen erhöhen [294]. Außerdem haben Zakyntios et al. [253] demonstriert, dass stark erhöhte IL-6-Plasmalevel konstant denen von TPO in septischen Patienten nachfolgen, weshalb IL-6 zu einer Überproduktion von TPO in der Leber führen könnte. Nicht abschließend bewiesen könnten unsere Daten darauf hindeuten, dass niedrigere Plasmalevel von IL-6 in TPO-behandelten Tieren damit zusammenhängen, dass exogen in hohen Dosen appliziertes TPO als negativer Feedback-Mechanismus auf die IL-6-Ausschüttung wirkt und diese limitiert.

7.2.2.3 Hepatozellulärer Zelltod

Die Apoptose ist im gesunden Gewebe ein vorhersehbares und kontrolliertes Geschehen, welches dafür sorgt, dass einzelne Zellen in einem Gewebe eliminiert werden, ohne die biologischen Funktionen des Gewebes zu beeinträchtigen. Morphologisch ist die Apoptose assoziiert mit nukleärer Kondensation, Zellschrumpfung und dem Auftreten von Apoptosekörperchen. In diversen Lebererkrankungen wie der viralen Hepatitis, der alkoholischen Hepatitis, des Ischämie/Reperfusionsschadens und des akuten Leberversagens spielt die durch TNF- α induzierte hepatozytäre Apoptose eine wesentliche Rolle [223, 235, 295]. Die Apoptose ist ein Merkmal der chronischen Lebererkrankung und die massive Apoptose ein Charakteristikum einer akuten Lebererkrankung, wie dem ALV [223]. Auf molekularer Ebene wird die Apoptose durch eine *death-effector-machinery* initiiert. Diese wird von einer Familie Aspartat-spezifischer Cystein-Proteasen, bekannt als Caspasen, gesteuert. Diese spalten vitale zelluläre Proteine und aktivieren proteolytisch Enzyme, die zur Zelloberfläche beitragen [296]. Es sind in der Literatur zwei voneinander getrennte Apoptose-Signalwege beschrieben worden, die unterschiedliche Initiator-Caspasen benötigen. Beide Signalwege laufen auf dem Level der Effektor-Caspasen zusammen [95]. Der *death-receptor*-Signalweg wird aktiviert, wenn Mitglieder der TNF-Superfamilie an der Zelloberfläche lokalisierten *death-receptors*, die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie sind, binden. Der

mitochondriale Signalweg wird durch die Interaktion zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der bcl-Familie gelenkt. Wenn intrazelluläre Sensoren einen verstärkten Zellschaden feststellen, sorgen Initiatoren für eine verstärkte mitochondriale Permeabilität. Die intermitochondriale Membran lässt proapoptotische Faktoren in das Cytosol entweichen. Die Schlüsselicaspase, an der beide Signalwege konvergieren, stellt die Caspase-3 dar.

Zum Zelltod führende Signalwege ermöglichen zahlreiche potentiell therapeutische Ziele [296, 297]. Es hat sich gezeigt, dass in der Sepsis nur die Blockade beider Apoptosesignalwege eine große Anzahl von Zellen schützen kann [95]. Eine Apoptose kann unter bestimmten Umständen eine inflammatorische Reaktion in der Leber auslösen [225]. In einem Tiermodell des cholestatischen Leberschadens wird vermutet, dass Kupfferzellen nach stattgehabter Apoptose maßgeblich an der Pathogenese einer inflammatorischen Antwort beteiligt sind [298]. Eine Verhinderung der Apoptose in der Leber könnte also zu einer verminderten Inflammation führen.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass TPO kein signifikantes antiapoptotisches Potential im endotoxämischen ALV besitzt. Die Prämedikation mit niedrig dosiertem rekombinanten TPO der Maus hatte keinen Effekt. Nach der Prämedikation von hoch dosiertem rekombinanten TPO der Maus zeigte sich ein geringes antiapoptotisches Potenzial. TPO scheint somit eine untergeordnete Rolle als Mediator des programmierten Zelltodes in der Leber zu spielen. Diese Feststellung erstaunt, wenn man den Einsatz von TPO in anderen Modellen betrachtet: Die Applikation von unphysiologisch hohen Dosen von TPO (75 µg/kg KG i.p.) in juvenile Ratten mit hypoxisch/ischämischem Hirnschaden resultierte in einer verstärkten Aktivierung von Caspase-3 in Neuronen, so dass daraus geschlossen wurde, dass TPO den apoptotischen programmierten Zelltod triggert [155]. In dieser Studie wurden mögliche Signalwege untersucht, die auch mit dem EPO-Rezeptorsystem assoziiert sind. So konnte die Blockierung der JAK-2-Phosphorylation oder des ERK1/2-Systems den TPO-induzierten Tod neuronaler Zellen komplett verhindern. Dagegen wurde in einer Studie von Baker et al. an einem Ischämie/Reperusionsmodell am Herzmuskel der Ratte rekombinantes TPO (12,5 mg/kg KG) ein anti-apoptotischer

Effekt zugesprochen [299]. Dabei wurde JAK-2 in der Reperfusionphase durch TPO phosphoryliert. Eine Inhibition dieses Signalweges verhinderte die protektive Wirkung. Des Weiteren wurde die Rolle der in der Kardioprotektion bekannten „pro-survival“-Kinase p44-MAPK untersucht. Dieser Kinase wurde zumindest ein partieller Anteil an der Kardioprotektion von TPO zugeschrieben. Diese Kinase ist bekannt, anti-apoptotische Gene der bcl-Familie verstärkt zu regulieren. Im TUNEL-Assay reduzierte TPO das Ausmaß der Apoptose. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Li et al., in welcher der apoptotische Zelltod nach Applikation von TPO in der Dosierung 12,5 µg/kg KG i.p. in einem Modell der Doxorubizin-(DOX)-induzierten Kardiotoxizität reduziert werden konnte [154]. DOX verstärkt am Herzmuskel den oxidativen Stress und unterdrückt die Bildung von endogenen Antioxidantien, wodurch der intrinsische mitochondriale Apoptose-Signalweg getriggert wird [300, 301]. Am Herzmuskel der Balb/c-Maus in vivo war die apoptotische Aktivität im Vergleich zwischen der Doxorubizin-Kontrollgruppe und der mit TPO behandelten Doxorubizin-Gruppe nur leicht aber nicht signifikant reduziert. In vitro verminderte TPO an einer H9C2-Zelllinie die Aktivierung von Caspase-3 signifikant. Die JC-1-Monomere zeigten einen Trend zur Reduktion des DOX-induzierten Schadens. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TPO zumindest am Herzmuskel in den oben beschriebenen, mitochondrialen Apoptose-Signalweg eingreifen kann.

Die derzeitige Datenlage erbringt somit Hinweise darauf, dass TPO via JAK-2-gekoppelte Signalwege in verschiedenen Zellen sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken kann. Unsere gewonnenen Daten konnten die Kontroverse um die Frage einer pro- oder antiapoptotischen Rolle von TPO nicht abschließend klären. Wir können derzeit nur schlussfolgern, dass TPO seine Wirkung offensichtlich organ- und dosisabhängig entfaltet.

In einer klinischen Studie, in der an Patienten mit schwerer Sepsis und Leberdysfunktion Apoptose- und Nekrosemarker gemessen wurden, war sowohl eine verstärkte Apoptose als auch eine verstärkte Nekrose zu beobachten. Im Vergleich zur Gruppe mit schwerer Sepsis ohne Leberdysfunktion konnten bei Patienten mit schwerer Sepsis und Leberfunktionsstörung besonders hohe Nekroseparameter

beobachtet werden [302]. Beide Formen des Zelltodes treten bei der Leberzellschädigung auf. Daneben können Zellen, die den Apoptoseweg eingeschlagen haben, erschöpfte Reserven von zellulärem Adenosintri-phosphat (ATP) aufweisen, was dann in eine sekundäre Nekrose der Zellen mündet [230]. Diese ist gekennzeichnet durch Zellschwellung und Lyse. Bis auf morphologische Veränderungen in vivo gibt es keine Möglichkeit, beide Mechanismen des Zelltodes eindeutig zu differenzieren. Die Kontroverse, welche Form des Zelltodes in den verschiedenen Ätiologien von Leberfunktionsstörungen überwiegt, ist noch nicht abschließend geklärt [303]. Bekannt ist, dass die Inflammation eine allgemeine Antwort auf extensiven Zelltod durch Nekrose ist [35]. Im Rahmen der hier vorgestellten Studie wurde ein Schädigungsmodell des ALV gewählt, bei dem eine Induktion von potenten proapoptotischen Signalen mit einer transkriptionalen Blockade gekoppelt ist. Neben der Apoptose kommt es auch hier zu einer zunächst milden und nach 8 h zu einer massiven Nekrose [158, 173]. Dies deckt sich mit der Aussage von Laster, dass TNF- α auch eine Nekrose von Zellen induzieren kann [304]. Durch die Erfassung der Transaminasen und des Enzyms GLDH konnten wir Aussagen zur hepatozellulären Integrität und zur Nekrose treffen. Nach Applikation von rekombinantem TPO im GalN/LPS-induzierten Leberschaden zeigten sich tendenziell - jedoch nicht signifikant - höhere Plasmakonzentrationen der Transaminasen und der GLDH. Unter der vereinfachten Annahme, dass die Plasmakonzentration insbesondere der GLDH mit dem Ausmaß der hepatozellulären Nekrose korreliert, müssen wir schlussfolgern, dass TPO zumindest im hier untersuchten Modell kein anti-nekrotisches Potenzial besitzt.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass rekombinantes TPO in einem Zustand des endotoxämischen ALV kein protektives Potenzial besitzt. Somit konnten die durch Le Minh et al. gezeigten positiven Eigenschaften von EPO, einem TPO strukturell ähnlichem Hormon, nicht nachgeahmt werden. Dies ist erstaunlich, da der c-mpl Rezeptor im septischen Leberversagen verstärkt exprimiert wird und TPO mit dem EPO-Rezeptor überlappende Signalwege nutzt. Die Sepsis stellt ein komplexes pathophysiologisches Krankheitsbild dar. Lemasters urteilte in einem Review-Paper wie folgt: „Die simultane Stimulation von potenten pro- und anti-apoptotischen

Signalwegen über Todes-Rezeptor-Liganden bedingt, teilweise durch die pleiotropen Effekte, dass Wissenschaftler konsterniert sind“ [224].

7.3 Folgerungen und Perspektiven

Das akute Leberversagen – die lebensbedrohliche Form des Leberschadens - ist bis heute zwar intensivmedizinisch unterstützend zu behandeln, eine kausale Therapie gibt es jedoch in der Regel nicht. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit ist erneut deutlich geworden, dass eine Schädigung der Leber aufgrund ihrer komplexen biochemischen Vorgänge und deren Zusammenspiel mit zahlreichen anderen Prozessen im Organismus mit pleiotrop wirkenden Substanzen behandelt werden sollte. Dieses vielfältige Wirkungsprofil könnte durch rekombinant hergestellte, körpereigene Stoffe oder durch künstlich hergestellte Substanzen erreicht werden.

Neben einer wirkungsvollen therapeutischen Substanz wird es nötig sein, den Zeitpunkt der Applikation optimal zu wählen. Die Phase der Inflammation müsste durch spezifische Marker genau kalkulierbar sein, um durch den Therapieansatz an entscheidender Stelle in das Immunsystem eingreifen zu können.

Studien konnten zeigen, dass TPO ein pleiotropes Wirkungsprofil besitzt. Der TPO-Rezeptor c-mpl wird während des septischen Leberschadens auf Hepatozyten und SEZ vermehrt exprimiert. Wenn TPO aufgrund der positiven Befunde beim Ischämie/Reperfusionsschaden am Herzmuskel intensiver untersucht wird und die Signalwege zunehmend verstanden werden, könnte dies die Wissensgrundlage legen, um in Studien TPO und dessen therapeutisches Potenzial an der Leber zielgerichtet weiter zu erforschen.

Erkenntnisse über die Regulationmechanismen von TPO durch die Leber könnten helfen, TPO auch in anderen Krankheitsbildern effektiver einzusetzen. Hinweise aus dieser Studie, die auf einen Zusammenhang im Regulationsmechanismus zwischen TPO und IL-6 hindeuten, könnten dazu beitragen.

Durch neue Testverfahren werden heute Leberdysfunktionen bereits in frühen Phasen diagnostiziert. Es hat sich gezeigt, dass während der Sepsis bei vielen Patienten eine subklinische Leberdysfunktion, das *toxic liver syndrome*, besteht. Grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse zum akuten Leberversagen, der klinischen Leberdysfunktion im Endstadium, könnten insofern an Sepsis erkrankten Patienten zu Gute kommen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Inzidenz der Sepsis weltweit zunimmt, sind neue Behandlungsansätze dringend notwendig. Die experimentelle Forschung an Modellen des Leberschadens ist insofern weiterhin von größtem Interesse für den Patienten.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lee, W., et al., *Acute liver failure: Summary of a workshop*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1401-1415.
2. Riordan, S. and R. Williams, *Perspectives on liver failure: past and future*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(2): p. 137-141.
3. O'Grady, J., S. Schalm, and R. Williams, *Acute liver failure: redefining the syndromes*. Lancet, 1993. **342**(8866): p. 273-275.
4. Rifai, K. and M. Bahr, *Akutes Leberversagen*. Der Internist, 2003. **44**(5): p. 585-598.
5. Lee, W., *Etiologies of acute liver failure*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(2): p. 142-152.
6. O'Grady, J., *Acute liver failure*. Postgrad Med J, 2005. **81**(953): p. 148-154.
7. Canbay, A., et al., *Acute liver failure in a metropolitan area in Germany: a retrospective study (2002 - 2008)*. Z Gastroenterol, 2009. **47**(9): p. 807-813.
8. Laterre, P., et al., *Hospital mortality and resource use in subgroups of the Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) trial*. Crit Care Med, 2004. **32**(11): p. 2207-2218.
9. Roberts, R., et al., *Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis*. Toxicol Sci, 2007. **96**(1): p. 2-15.
10. Bilzer, M., F. Roggel, and A. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. Liver Int, 2006. **26**(10): p. 1175-1186.
11. Grewe, M., et al., *Regulation of the mRNA expression for tumor necrosis factor-alpha in rat liver macrophages*. J Hepatol, 1994. **20**(6): p. 811-818.
12. Jaeschke, H. and A. Farhood, *Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(2): p. 210-219.
13. Czaja, M., *Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(4): p. 378-389.
14. Jaeschke, H., *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(7): p. 718-724.
15. Eipel, C., et al., *Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(3): p. 406-13.
16. Vollmar, B. and M. Menger, *The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair*. Physiol Rev, 2009. **89**(4): p. 1269-1339.
17. Luster, A., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-445.

18. Maher, J., et al., *Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 624-630.
19. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-1327.
20. Ho, J., et al., *Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(5): p. 716-724.
21. Lawson, J., et al., *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**(3): p. 761-767.
22. Eipel, C., et al., *Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(5): p. G769-76.
23. Feder, L., J. Todaro, and D. Laskin, *Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages*. J Leukoc Biol, 1993. **53**(2): p. 126-132.
24. Smedsrød, B., et al., *Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells*. Gut, 1994. **35**(11): p. 1509-1516.
25. Spolarics, Z., *Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(5): p. 534-541.
26. Nanji, A., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 expression in experimental alcoholic liver disease: relationship to endotoxemia and TNF alpha messenger RNA*. Exp Mol Pathol, 1995. **62**(1): p. 42-51.
27. Ito, Y., et al., *Mechanisms and pathophysiological implications of sinusoidal endothelial cell gap formation following treatment with galactosamine/endotoxin in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(2): p. G211-218.
28. Pannen, B., *New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion*. Anesth Analg, 2002. **94**(6): p. 1448-1457.
29. Rubanyi, G. and M. Polokoff, *Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(3): p. 325-415.
30. Pannen, B.H., et al., *Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat*. Hepatology, 1998. **27**(3): p. 755-64.
31. Kanduc, D., et al., *Cell death: apoptosis versus necrosis (review)*. Int J Oncol, 2002. **21**(1): p. 165-170.
32. Lemasters, J., et al., *Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(5): p. 769-781.

33. Sun, F., et al., *Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by D-galactosamine in rat liver*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **65**(1): p. 101-107.
34. Formigli, L., et al., *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(1): p. 41-49.
35. Scaffidi, P., T. Misteli, and M. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 191-195.
36. Kortgen, A., et al., *Prospective assessment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill*. *Shock*, 2009. **32**(4): p. 358-365.
37. Sakka, S., K. Reinhart, and A. Meier-Hellmann, *Prognostic value of the indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients*. *Chest*, 2002. **122**(5): p. 1715-1720.
38. Arrigoni, A., et al., *Monoethylglycinexylidide test: a prognostic indicator of survival in cirrhosis*. *Hepatology*, 1994. **20**(2): p. 383-387.
39. Schröter, J., et al., *Lignocaine metabolite formation: an indicator for liver dysfunction and predictor of survival in surgical intensive care patients*. *Anaesthesia*, 1995. **50**(10): p. 850-854.
40. Bauer, M., M. Paxian, and A. Kortgen, *[Acute liver failure. Current aspects of diagnosis and therapy]*. *Anaesthesist*, 2004. **53**(6): p. 511-530.
41. Schellinger, P., et al., *[Hepatic encephalopathy]*. *Nervenarzt*, 2003. **74**(12): p. 1078-1087.
42. Auzinger, G. and J. Wendon, *Intensive care management of acute liver failure*. *Curr Opin Crit Care*, 2008. **14**(2): p. 179-188.
43. Bernal, W., et al., *Intensive care management of acute liver failure*. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(2): p. 188-200.
44. Whyte, I., B. Francis, and A. Dawson, *Safety and efficacy of intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen overdose: analysis of the Hunter Area Toxicology Service (HATS) database*. *Curr Med Res Opin*, 2007. **23**(10): p. 2359-2368.
45. Lee, W., et al., *Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(3): p. 856-864, 864.e1.
46. Enjalbert, F., et al., *Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis*. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2002. **40**(6): p. 715-757.
47. Beucher, G., T. Simonet, and M. Dreyfus, *[Management of the HELLP syndrome]*. *Gynecol Obstet Fertil*, 2008. **36**(12): p. 1175-1190.
48. Tillmann, H., et al., *Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience*. *J Viral Hepat*, 2006. **13**(4): p. 256-263.

49. O'Grady, J., et al., *Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure*. Gastroenterology, 1988. **94**(5 Pt 1): p. 1186-1192.
50. Ellis, A., et al., *Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure*. Hepatology, 1996. **24**(6): p. 1446-1451.
51. Demetriou, A., et al., *Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure*. Ann Surg, 2004. **239**(5): p. 660-667; discussion 667-6670.
52. Rifai, K., et al., *Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure*. J Hepatol, 2003. **39**(6): p. 984-990.
53. Tan, H., *Molecular adsorbent recirculating system (MARS)*. Ann Acad Med Singapore, 2004. **33**(3): p. 329-35.
54. Camus, C., et al., *Molecular adsorbent recirculating system dialysis in patients with acute liver failure who are assessed for liver transplantation*. Intensive Care Med, 2006. **32**(11): p. 1817-1825.
55. Polson, J. and W. Lee, *AASLD position paper: the management of acute liver failure*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1179-1197.
56. Bundesärztekammer, *Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 und 5 TPG – Regeln zur Aufnahme in die Warteliste und zur Organvermittlung (Stand:18.12.2009), S.44, 2009*.
57. Chenard-Neu, M., et al., *Auxiliary liver transplantation: regeneration of the native liver and outcome in 30 patients with fulminant hepatic failure--a multicenter European study*. Hepatology, 1996. **23**(5): p. 1119-1127.
58. Blei, A., *Selection for acute liver failure: have we got it right?* Liver Transpl, 2005(11 Suppl 2): p. S30-34.
59. O'Grady, J., et al., *Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure*. Gastroenterology, 1989. **97**(2): p. 439-445.
60. O'Grady, J., *Prognostication in acute liver failure: a tool or an anchor?* Liver Transpl, 2007. **13**(6): p. 786-787.
61. Riordan, S. and R. Williams, *Mechanisms of hepatocyte injury, multiorgan failure, and prognostic criteria in acute liver failure*. Semin Liver Dis, 2003. **23**(3): p. 203-15.
62. Marudanayagam, R., et al., *Aetiology and outcome of acute liver failure*. HPB (Oxford), 2009. **11**(5): p. 429-434.
63. Bone, R., et al., *Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group*. Crit Care Med, 1989. **17**(5): p. 389-393.
64. Bone, R., et al., *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-1655.

-
65. Marino, P.L. and K.M. Sutin, *The ICU book*. 3rd ed 2007, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xvii, 1065 p.
 66. Dombrovskiy, V., et al., *Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003*. Crit Care Med, 2007. **35**(5): p. 1244-1250.
 67. Moerer, O. and M. Quintel, [*Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects*]. Internist (Berl), 2009. **50**(7): p. 788, 790-794, 796-798.
 68. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-618.
 69. Martin, G., D. Mannino, and M. Moss, *The effect of age on the development and outcome of adult sepsis*. Crit Care Med, 2006. **34**(1): p. 15-21.
 70. Bone, R., *The pathogenesis of sepsis*. Ann Intern Med, 1991. **115**(6): p. 457-469.
 71. Warren, H., *Strategies for the treatment of sepsis*. N Engl J Med, 1997. **336**(13): p. 952-953.
 72. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L. Moldawer, *Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity*. Shock, 2001. **16**(2): p. 83-96.
 73. Hotchkiss, R., et al., *Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2493-2500.
 74. Hauber, H. and P. Zabel, [*Pathophysiology and pathogens of sepsis*]. Internist (Berl), 2009. **50**(7): p. 779-780, 782-784, 786-787.
 75. Janeway, C.J. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
 76. Thomas, C., et al., *Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 147-156.
 77. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-2088.
 78. Riedemann, N., et al., *Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1355-1359.
 79. Tracey, K., *The inflammatory reflex*. Nature. **420**(6917): p. 853-859.
 80. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 791-800.
 81. Lotze, M. and K. Tracey, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 331-342.
 82. Wang, H., et al., *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. Science, 1999. **285**(5425): p. 248-251.

-
83. Weaver, C., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-852.
 84. Levi, M. and T. van der Poll, *Inflammation and coagulation*. Crit Care Med, 2010. **38**(2 Suppl): p. S26-34.
 85. Levi, M., et al., *Infection and inflammation and the coagulation system*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(1): p. 26-39.
 86. Cinel, I. and R. Dellinger, *Advances in pathogenesis and management of sepsis*. Curr Opin Infect Dis, 2007. **20**(4): p. 345-352.
 87. Trzeciak, S., et al., *Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival*. Ann Emerg Med, 2007. **49**(1): p. 88-98, 98.e1-2.
 88. Vollmar, B., C. Eipel, and M.D. Menger, *Organdysfunktion und gestörte Mikrozirkulation des septischen Patienten*. Viszeralchirurgie, 2006. **41**: p. 11-17.
 89. Ferro, T., et al., *Protein kinase C-alpha mediates endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(6): p. L1107-1117.
 90. Aird, W., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3765-77.
 91. Piagnerelli, M., et al., *Red blood cell rheology in sepsis*. Intensive Care Med, 2003. **29**(7): p. 1052-1061.
 92. Yodice, P., et al., *Neutrophil rheologic changes in septic shock*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(1): p. 38-42.
 93. Tenhunen, J., *In death, truth lies: why do patients with sepsis die?* Anesth Analg, 2009. **108**(6): p. 1731-1733.
 94. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-891.
 95. Hotchkiss, R., et al., *Cell death*. N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1570-1583.
 96. Antoniadou, C., et al., *The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure*. J Hepatol, 2008. **49**(5): p. 845-861.
 97. Kumar, A., et al., *Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. Crit Care Med, 2006. **34**(6): p. 1589-1596.
 98. Gleckman, R. and D. Hibert, *Afebrile bacteremia. A phenomenon in geriatric patients*. JAMA, 1982. **248**(12): p. 1478-81.
 99. Hotchkiss, R. and I. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 138-150.

100. Lever, A. and I. Mackenzie, *Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis*. BMJ, 2007. **335**(7625): p. 879-883.
101. Brunkhorst, F. and K. Reinhart, [*Diagnosis and causal treatment of sepsis*]. Internist (Berl), 2009. **50**(7): p. 810-816.
102. Harbarth, S., et al., *Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(3): p. 396-402.
103. Dellinger, R., et al., *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008*. Crit Care Med, 2008. **36**(1): p. 296-327.
104. Abraham, E., et al., *Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death*. N Engl J Med, 2005. **353**(13): p. 1332-1341.
105. Bernard, G., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 699-709.
106. Levi, M., et al., *Prophylactic heparin in patients with severe sepsis treated with drotrecogin alfa (activated)*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(5): p. 483-490.
107. Rolando, N., et al., *The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure*. Hepatology, 2000. **32**(4 Pt 1): p. 734-739.
108. O'Brien, J.J., N. Ali, and E. Abraham, *Year in review 2007: Critical Care--multiple organ failure and sepsis*. Crit Care, 2008. **12**(5): p. 228.
109. Mikkelsen, M., et al., *Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock*. Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1670-1677.
110. Levi, M. and E. Löwenberg, *Thrombocytopenia in critically ill patients*. Semin Thromb Hemost, 2008. **34**(5): p. 417-424.
111. Collin, S., N. Sennoun, and B. Levy, *Cardiovascular and metabolic responses to catecholamine and sepsis prognosis: a ubiquitous phenomenon?* Crit Care, 2008. **12**(2): p. 118.
112. Moutzouri, A., et al., *Red blood cell deformability in patients with sepsis: a marker for prognosis and monitoring of severity*. Clin Hemorheol Microcirc, 2007. **36**(4): p. 291-299.
113. Zimmerman, J., et al., *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) IV: hospital mortality assessment for today's critically ill patients*. Crit Care Med, 2006. **34**(5): p. 1297-1310.
114. Bradley, T. and D. Metcalf, *The growth of mouse bone marrow cells in vitro*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1966. **44**(3): p. 287-299.
115. Pluznik, D. and L. Sachs, *The cloning of normal "mast" cells in tissue culture*. J Cell Physiol, 1965. **66**(3): p. 319-324.

-
116. Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2034-2045.
 117. Metcalf, D., *The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications*. Cancer, 1990. **65**(10): p. 2185-2195.
 118. Davignon, J. and L. Leiter, *Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(1): p. 29-40.
 119. Arcasoy, M., *The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin*. Br J Haematol, 2008. **141**(1): p. 14-31.
 120. Merchionne, F. and F. Dammacco, *Biological functions and therapeutic use of erythropoiesis-stimulating agents: perplexities and perspectives*. Br J Haematol, 2009. **146**(2): p. 127-141.
 121. Kelemen, E., I. Cserhati, and B. Tanos, *Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera*. Acta Haematol, 1958. **20**(6): p. 350-5.
 122. Vigon, I., et al., *Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5640-5644.
 123. Bartley, T., et al., *Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl*. Cell, 1994. **77**(7): p. 1117-1124.
 124. Sohma, Y., et al., *Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene*. FEBS Lett, 1994. **353**(1): p. 57-61.
 125. Sungaran, R., B. Markovic, and B. Chong, *Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization*. Blood, 1997. **89**(1): p. 101-107.
 126. Lok, S., et al., *Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo*. Nature, 1994. **369**(6481): p. 565-8.
 127. Hunt, P., et al., *Purification and biologic characterization of plasma-derived megakaryocyte growth and development factor*. Blood, 1995. **86**(2): p. 540-547.
 128. Linden, H. and K. Kaushansky, *The glycan domain of thrombopoietin enhances its secretion.*, 2000. p. 3044-3051.
 129. Harker, L., et al., *Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates*. Blood, 1996. **88**(2): p. 511-521.
 130. Muto, T., et al., *Functional analysis of the C-terminal region of recombinant human thrombopoietin. C-terminal region of thrombopoietin is a "shuttle" peptide to help secretion*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12090-4.

131. Vadhan-Raj, S., et al., *Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer*. Ann Intern Med, 1997. **126**(9): p. 673-681.
132. Geddis, A., H. Linden, and K. Kaushansky, *Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(1): p. 61-73.
133. Kuter, D. and R. Rosenberg, *The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2720-2730.
134. Kaser, A., et al., *Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2720-2725.
135. Gurney, A., et al., *Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice*. Science, 1994. **265**(5177): p. 1445-1447.
136. Alexander, W., et al., *Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2162-2170.
137. Zauli, G., et al., *In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2234-2243.
138. Kaushansky, K., et al., *Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin*. Nature, 1994. **369**(6481): p. 568-71.
139. Kuter, D., D. Beeler, and R. Rosenberg, *The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11104-11108.
140. Rasko, J., E. O'Flaherty, and C. Begley, *Mpl ligand (MGDF) alone and in combination with stem cell factor (SCF) promotes proliferation and survival of human megakaryocyte, erythroid and granulocyte/macrophage progenitors*. Stem Cells, 1997. **15**(1): p. 33-42.
141. Ku, H., et al., *Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice*. Blood, 1996. **87**(11): p. 4544-4551.
142. Carver-Moore, K., et al., *Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice*. Blood, 1996. **88**(3): p. 803-808.
143. Choi, E., et al., *The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis*. Br J Haematol, 1996. **95**(2): p. 227-233.
144. Peng, J., et al., *Relative reactivity of platelets from thrombopoietin- and interleukin-6-treated dogs*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4158-4163.
145. Zauli, G., et al., *Thrombopoietin enhances the alpha IIb beta 3-dependent adhesion of megakaryocytic cells to fibrinogen or fibronectin through PI 3 kinase*. Blood, 1997. **89**(3): p. 883-895.

-
146. Li, J., Y. Xia, and D. Kuter, *Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics*. Br J Haematol, 1999. **106**(2): p. 345-356.
 147. Menger, M. and B. Vollmar, *Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds?* Transplant Proc, 2007. **39**(2): p. 485-488.
 148. Metcalf, D., *Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?* Blood, 1993. **82**(12): p. 3515-23.
 149. Muta, K., et al., *Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 34-43.
 150. Ghezzi, P. and M. Brines, *Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S37-S44.
 151. Jelkmann, W. and K. Wagner, *Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin*. Ann Hematol, 2004. **83**(11): p. 673-686.
 152. Le Minh, K., et al., *Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1954-1963.
 153. Kaushansky, K., et al., *Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy*. J Clin Invest, 1995. **96**(3): p. 1683-1687.
 154. Li, K., et al., *Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin*. Circulation, 2006. **113**(18): p. 2211-2220.
 155. Ehrenreich, H., et al., *A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 862-867.
 156. Morikawa, A., et al., *Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model*. Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 734-738.
 157. Klintman, D., et al., *Staphylococcal enterotoxin A-induced hepatotoxicity is predominantly mediated by Fas ligand (CD95L)*. Ann Surg, 2004. **240**(6): p. 1065-1072; discussion 1072-1073.
 158. Leist, M., et al., *Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1220-1234.
 159. Lichtman, J. and J. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nat Methods, 2005. **2**(12): p. 910-919.
 160. Bergmeyer, H., P. Scheibe, and A. Wahlefeld, *Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase*. Clin Chem, 1978. **24**(1): p. 58-73.

-
161. Freise, H., U. Brückner, and H. Spiegel, *Animal models of sepsis*. J Invest Surg, 2001. **14**(4): p. 195-212.
162. Bélanger, M. and R. Butterworth, *Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models*. Metab Brain Dis, 2005. **20**(4): p. 409-423.
163. Newsome, P., et al., *Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation*. Liver Transpl, 2000. **6**(1): p. 21-31.
164. Terblanche, J. and R. Hickman, *Animal models of fulminant hepatic failure*. Dig Dis Sci, 1991. **36**(6): p. 770-774.
165. Tuñón, M., et al., *An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(25): p. 3086-3098.
166. Tunon, M., et al., *Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure*. J Lab Clin Med, 2003. **141**(4): p. 272-278.
167. Corcoran, G., et al., *Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine*. Mol Pharmacol, 1980. **18**(3): p. 536-542.
168. Roberts, D., et al., *Immunohistochemical localization and quantification of the 3-(cystein-S-yl)-acetaminophen protein adduct in acetaminophen hepatotoxicity*. Am J Pathol, 1991. **138**(2): p. 359-371.
169. Gregus, Z., C. Madhu, and C. Klaassen, *Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen in vivo: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **244**(1): p. 91-99.
170. Miller, D., et al., *An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study*. Gastroenterology, 1976. **71**(1): p. 109-113.
171. Silverstein, R., *D-galactosamine lethality model: scope and limitations*. J Endotoxin Res, 2004. **10**(3): p. 147-162.
172. Keppler, D., et al., *The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine. D-glucosamine, and 2-deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis*. Eur J Biochem, 1970. **17**(2): p. 246-253.
173. Tapalaga, D., G. Tiegs, and S. Angermüller, *NFkappaB and caspase-3 activity in apoptotic hepatocytes of galactosamine-sensitized mice treated with TNFalpha*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(12): p. 1599-1609.
174. Rahman, T. and H. Hodgson, *Animal models of acute hepatic failure*. Int J Exp Pathol, 2000. **81**(2): p. 145-157.
175. Rubin, D., et al., *Antigenic loss in a transplantable, chemically induced leukemia of C57BL/6 mice*. J Natl Cancer Inst, 1970. **44**(4): p. 975-9.

-
176. Vladoianu, I. and F. Dubini, *Experimental model of oral antityphoid vaccination with live streptomycin-dependent Salmonella typhimurium in C57BL/6 mice*. J Hyg (Lond), 1975. **75**(2): p. 215-218.
177. Enjuanes, L., J. Lee, and J. Ihle, *Antigenic specificities of the cellular immune response of C57BL/6 mice to the Moloney leukemia/sarcoma virus complex*. J Immunol, 1979. **122**(2): p. 665-674.
178. Zawatzky, R., et al., *The role of interferon in the resistance of C57BL/6 mice to various doses of herpes simplex virus type 1*. J Infect Dis, 1982. **146**(3): p. 405-410.
179. Banerji, T., T. Parkening, and T. Collins, *Effects of aging on the activity of hypothalamic dopamine-beta-hydroxylase during various stages of the estrous cycle in C57BL/6 mice*. Neuroendocrinology, 1982. **34**(1): p. 14-19.
180. Kiianmaa, K., P. Hoffman, and B. Tabakoff, *Antagonism of the behavioral effects of ethanol by naltrexone in BALB/c, C57BL/6, and DBA/2 mice*. Psychopharmacology (Berl), 1983. **79**(4): p. 291-294.
181. Willott, J., R. Demuth, and S. Lu, *Excitability of auditory neurons in the dorsal and ventral cochlear nuclei of DBA/2 and C57BL/6 mice*. Exp Neurol, 1984. **83**(3): p. 495-506.
182. Williams, L., K. Udupa, and D. Lipshitz, *Evaluation of the effect of age on hematopoiesis in the C57BL/6 mouse*. Exp Hematol, 1986. **14**(9): p. 827-832.
183. Doggrell, S., *Suramin: potential in acute liver failure*. Expert Opin Investig Drugs, 2004. **13**(10): p. 1361-1363.
184. Endo, Y., et al., *Enhancement by galactosamine of lipopolysaccharide(LPS)-induced tumour necrosis factor production and lethality: its suppression by LPS pretreatment*. Br J Pharmacol, 1999. **128**(1): p. 5-12.
185. Galanos, C., M. Freudenberg, and W. Reutter, *Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(11): p. 5939-5943.
186. Knisely, M. and W. Stratman-Thomas, *Microscopic observations of intravascular agglutination of red cells and consequent sludging of blood in rhesus monkeys infected with knowlesi malaria*. Anat Rec, 1948. **101**(4): p. 701.
187. Vollmar, B. and M. Menger, *The use of intravital microscopy in surgical research. 26-years of experience analyzed by studies presented at the Surgical Forum of the Annual Congress of the German Society of Surgery*. Langenbecks Arch Surg, 1998. **383**(3-4): p. 282-285.
188. Winet, H., *The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy*. Bone, 1996. **19**(1 Suppl): p. 39S-57S.
189. Vajkoczy, P., A. Ullrich, and M. Menger, *Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation*. Neoplasia, 2000. **2**(1-2): p. 53-61.
190. Sorg, H., C. Krueger, and B. Vollmar, *Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber*. J Anat, 2007. **211**(6): p. 810-818.

191. Siegel-Axel, D., et al., *[Role of platelets in atherosclerosis and inflammation]*. Med Klin (Munich), 2006. **101**(6): p. 467-475.
192. Ohman, M., et al., *Monocyte Chemoattractant Protein-1 Deficiency Protects Against Visceral Fat-Induced Atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010.
193. Hoffmann, J., et al., *Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia*. Crit Care Med, 2004. **32**(4): p. 1011-1017.
194. Allman, M., et al., *Leptin induces an inflammatory phenotype in lean wistar rats*. Mediators Inflamm, 2009. **2009**: p. 738620.
195. Katada, K., et al., *Carbon monoxide liberated from CO-releasing molecule (CORM-2) attenuates ischemia/reperfusion (I/R)-induced inflammation in the small intestine*. Inflammation, 2010. **33**(2): p. 92-100.
196. Vollmar, B., A. Senkel, and M. Menger, *In vivo evidence that intercellular adhesion molecule-1 does not mediate endotoxin-induced hepatic leukocyte-endothelial cell interaction*. J Hepatol, 1995. **23**(5): p. 613-616.
197. Sorg, H., et al., *Early rise in inflammation and microcirculatory disorder determine the development of autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **295**(6): p. G1274-1280.
198. Khandoga, A., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis*. Microvasc Res, 2003. **65**(2): p. 71-77.
199. Zapletal, C., et al., *Effects of hemodilution with a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on ischemia/reperfusion injury in a model of partial warm liver ischemia of the rat*. Microvasc Res, 2009. **78**(3): p. 386-392.
200. Vollmar, B., et al., *Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion*. Am J Pathol, 1994. **145**(6): p. 1421-31.
201. Slotta, J., et al., *Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) induce early hepatic injury, but provide a late window for protection against endotoxin-mediated liver damage*. J Hepatol, 2006. **44**(3): p. 576-585.
202. Prinzen, F. and J. Bassingthwaite, *Blood flow distributions by microsphere deposition methods*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(1): p. 13-21.
203. Prinzen, F. and R. Glenn, *Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(10): p. 1467-1475.
204. Vollmar, B., et al., *Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage*. Anesth Analg, 1992. **75**(3): p. 421-430.
205. Almond, N. and A. Wheatley, *Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry*. Am J Physiol, 1992. **262**(2 Pt 1): p. G203-209.
206. Wheatley, A., et al., *Interpretation of the laser Doppler flow signal from the liver of the rat*. Microvasc Res, 1993. **45**(3): p. 290-301.

-
207. von Spiegel, T., et al., *Perioperative monitoring of indocyanine green clearance and plasma disappearance rate in patients undergoing liver transplantation*. *Anaesthesist*, 2002. **51**(5): p. 359-66.
208. Jourdan, M., et al., *Effect of aging on liver functions-an experimental study in a perfused rat liver model*. *Exp Gerontol*, 2004. **39**(9): p. 1341-1346.
209. Wang, P., et al., *Measurement of hepatic blood flow after severe hemorrhage: lack of restoration despite adequate resuscitation*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(1 Pt 1): p. G92-98.
210. El-Desoky, A., et al., *Assessment of hepatic ischaemia reperfusion injury by measuring intracellular tissue oxygenation using near infrared spectroscopy*. *Liver*, 2001. **21**(1): p. 37-44.
211. Daemen, M., et al., *Liver blood flow measurement in the rat. The electromagnetic versus the microsphere and the clearance methods*. *J Pharmacol Methods*, 1989. **21**(4): p. 287-97.
212. Groner, W., et al., *Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation*. *Nat Med*, 1999. **5**(10): p. 1209-1212.
213. Puhl, G., et al., *Noninvasive in vivo analysis of the human hepatic microcirculation using orthogonal polarization spectral imaging*. *Transplantation*, 2003. **75**(6): p. 756-761.
214. Boerma, E., et al., *Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study*. *Crit Care*, 2005. **9**(6): p. R601-606.
215. Milstein D M J, L.J.A.H., Ince C, *Sidestream dark-field imaging and image analysis of oral microcirculation under clinical conditions; Chapter 6; Anaesthesia, pain, intensive care and emergency A.P.I.C.E. ; proceedings of the 20th postgraduate course in critical care medicine, Trieste, Italy - November 18-21, 2005*, 2006, Springer: Milan.
216. Ince, C., *The microcirculation is the motor of sepsis*. *Crit Care*, 2005. **9 Suppl 4**: p. S13-S19.
217. Bauer, I., et al., *Chronic ethanol consumption exacerbates liver injury following hemorrhagic shock: role of sinusoidal perfusion failure*. *Shock*, 1995. **4**(5): p. 324-331.
218. Clemens, M., et al., *Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment*. *Am J Physiol*, 1985. **248**(6 Pt 2): p. H804-811.
219. Roller, J., et al., *Heme oxygenase (HO)-1 protects from lipopolysaccharide (LPS)-mediated liver injury by inhibition of hepatic leukocyte accumulation and improvement of microvascular perfusion*. *Langenbecks Arch Surg*, 2010. **395**(4): p. 387-394.
220. Jaeschke, H., et al., *Protection against TNF-induced liver parenchymal cell apoptosis during endotoxemia by a novel caspase inhibitor in mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000. **169**(1): p. 77-83.

-
221. Ramaiah, S. and H. Jaeschke, *Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(6): p. 757-766.
222. Rutherford, A. and R. Chung, *Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration*. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(2): p. 167-174.
223. Malhi, H. and G. Gores, *Cellular and molecular mechanisms of liver injury*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(6): p. 1641-1654.
224. Lemasters, J., *Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 351-360.
225. Jaeschke, H., *Inflammation in response to hepatocellular apoptosis*. *Hepatology*, 2002. **35**(4): p. 964-966.
226. El-Gibaly, A., et al., *Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis*. *Hepatology*, 2004. **39**(6): p. 1553-1562.
227. Schäfer, T., et al., *Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death*. *FASEB J*, 2003. **17**(6): p. 660-667.
228. Giartosio, A., et al., *The interaction of bisbenzimidazole with DNA*. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1984. **16**(6): p. 481-490.
229. Bazhulina, N., et al., *Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA*. *J Biomol Struct Dyn*, 2009. **26**(6): p. 701-18.
230. Jaeschke, H., J. Gujral, and M. Bajt, *Apoptosis and necrosis in liver disease*. *Liver Int*, 2004. **24**(2): p. 85-89.
231. Ozer, J., et al., *The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity*. *Toxicology*, 2008. **245**(3): p. 194-205.
232. Jaeschke, H., et al., *Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model*. *J Immunol*, 1998. **160**(7): p. 3480-3486.
233. O'Brien, P., et al., *Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats*. *Lab Anim*, 2002. **36**(3): p. 313-321.
234. Rutherford, A., et al., *Serum apoptosis markers in acute liver failure: a pilot study*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. **5**(12): p. 1477-1483.
235. Nagaki, M. and H. Moriwaki, *Implication of cytokines: Roles of tumor necrosis factor-alpha in liver injury*. *Hepatol Res*, 2008. **38**(s1) The 6 Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Liver Failure: Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September 2007, Iwate, Japan): p. S19-S28.
236. Höflich, C. and H. Volk, *[Immunomodulation in sepsis]*. *Chirurg*, 2002. **73**(11): p. 1100-1114.
237. de Sauvage, F., et al., *Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand*. *Nature*, 1994. **369**(6481): p. 533-538.

-
238. Cosman, D., et al., *A new cytokine receptor superfamily*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(7): p. 265-270.
239. Yamaoka, K., et al., *The Janus kinases (Jaks)*. Genome Biol, 2004. **5**(12): p. 253.
240. Bondurant, M. and M. Koury, *Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(7): p. 2731-2733.
241. Chatterjee, P., *Pleiotropic renal actions of erythropoietin*. Lancet, 2005. **365**(9474): p. 1890-1892.
242. Brines, M. and A. Cerami, *Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise*. Kidney Int, 2006. **70**(2): p. 246-250.
243. Cuzzocrea, S., et al., *Erythropoietin reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice*. Crit Care Med, 2006. **34**(4): p. 1168-1177.
244. Anagnostou, A., et al., *Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(15): p. 5978-5982.
245. Beleslin-Cokic, B., et al., *Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2073-2080.
246. Martínez-Estrada, O., et al., *Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(9): p. 2538-2544.
247. Cardier, J. and J. Dempsey, *Thrombopoietin and its receptor, c-mpl, are constitutively expressed by mouse liver endothelial cells: evidence of thrombopoietin as a growth factor for liver endothelial cells*. Blood, 1998. **91**(3): p. 923-929.
248. Ichiba, M., et al., *Dual effects of adenovirus-mediated thrombopoietin gene transfer on hepatic oval cell proliferation and platelet counts*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(3): p. 723-729.
249. Peck-Radosavljevic, M., et al., *Is inadequate thrombopoietin production a major cause of thrombocytopenia in cirrhosis of the liver?* J Hepatol, 1997. **27**(1): p. 127-131.
250. Peck-Radosavljevic, M., *Thrombocytopenia in liver disease*. Can J Gastroenterol, 2000. **14 Suppl D**: p. 60D-66D.
251. Yang, C., Y. Li, and D. Kuter, *The physiological response of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to thrombocytopenia in the rat*. Br J Haematol, 1999. **105**(2): p. 478-485.
252. Stoffel, R., A. Wiestner, and R. Skoda, *Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets*. Blood, 1996. **87**(2): p. 567-573.
253. Zakyntinos, S., et al., *Sepsis severity is the major determinant of circulating thrombopoietin levels in septic patients*. Crit Care Med, 2004. **32**(4): p. 1004-1010.
254. Kitchens, C., *Thrombocytopenia and thrombosis in disseminated intravascular coagulation (DIC)*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 240-246.

-
255. Matuschak, G., et al., *Liver-lung interactions following Escherichia coli bacteremic sepsis and secondary hepatic ischemia/reperfusion injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(4): p. 1002-1009.
256. Croner, R., et al., *Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia*. Crit Care, 2006. **10**(1): p. R15.
257. Singer, G., et al., *Platelet recruitment in the murine hepatic microvasculature during experimental sepsis: role of neutrophils*. Microcirculation, 2006. **13**(2): p. 89-97.
258. Spapen, H., *Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure*. Anat Rec (Hoboken), 2008. **291**(6): p. 714-720.
259. Antoniadou, C.G., P.A. Berry, and J. Wendon, *Immunoparalysis in Liver Disease*, 2006. p. 650-660.
260. Vollmar, B., et al., *[Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function]*. Zentralbl Chir, 1993. **118**(4): p. 218-225.
261. Roesner, J., et al., *Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats*. Intensive Care Med, 2006. **32**(10): p. 1649-1657.
262. Wunder, C., N. Roewer, and O. Eichelbrönner, *[Main determinants of liver microcirculation during systemic inflammation]*. Anaesthesist, 2004. **53**(11): p. 1073-1085.
263. Jaeschke, H., A. Farhood, and C. Smith, *Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo*. FASEB J, 1990. **4**(15): p. 3355-3359.
264. Jaeschke, H., A. Farhood, and C. Smith, *Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism*. Am J Physiol, 1991. **261**(6 Pt 1): p. G1051-G1056.
265. Molnar, R., et al., *The role of neutrophils in producing hepatocellular dysfunction during the hyperdynamic stage of sepsis in rats*. J Surg Res, 1997. **73**(2): p. 117-122.
266. Bautista, A., *Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver*. Hepatology, 1997. **25**(2): p. 335-342.
267. Gujral, J., et al., *Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 355-363.
268. Horie, Y., et al., *Leukocyte adhesion and hepatic microvascular responses to intestinal ischemia/reperfusion in rats*. Gastroenterology, 1996. **111**(3): p. 666-673.
269. Bonder, C., et al., *Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 45-53.

-
270. Dahm, L., A. Schultze, and R. Roth, *An antibody to neutrophils attenuates alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury*. J Pharmacol Exp Ther, 1991. **256**(1): p. 412-420.
271. Jaeschke, H. and C. Smith, *Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(6): p. 647-653.
272. Wong, J., et al., *A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2782-2790.
273. Vollmar, B., et al., *Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence*. Surgery, 1995. **117**(2): p. 195-200.
274. Gujral, J., et al., *Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G499-507.
275. Essani, N., et al., *Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(3): p. 288-296.
276. Delves, P. and I. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
277. Delves, P. and I. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-117.
278. Joseph, S., K. Miner, and M. Croft, *Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 277-289.
279. Essani, N., et al., *Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure*. Hepatology, 1995. **21**(6): p. 1632-1639.
280. Angermüller, S., G. Künstle, and G. Tiegs, *Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNFalpha-treated galactosamine-sensitized mice*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(10): p. 1175-1183.
281. Cazanave, S., et al., *Ibuprofen administration attenuates serum TNF-alpha levels, hepatic glutathione depletion, hepatic apoptosis and mouse mortality after Fas stimulation*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **231**(3): p. 336-343.
282. Langdale, L., et al., *Suppressor of cytokine signaling expression with increasing severity of murine hepatic ischemia-reperfusion injury*. J Hepatol, 2008. **49**(2): p. 198-206.
283. Möller, B. and P. Villiger, *Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **27**(4): p. 391-408.
284. Cuzzocrea, S., et al., *Role of interleukin-6 in a non-septic shock model induced by zymosan*. Eur Cytokine Netw, 1999. **10**(2): p. 191-203.

-
285. Cressman, D., et al., *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1379-1383.
286. Deutschman, C., et al., *Sepsis-induced cholestasis, steatosis, hepatocellular injury, and impaired hepatocellular regeneration are enhanced in interleukin-6 -/- mice*. Crit Care Med, 2006. **34**(10): p. 2613-2620.
287. Hecht, N., et al., *Hyper-IL-6 gene therapy reverses fulminant hepatic failure*. Mol Ther, 2001. **3**(5 Pt 1): p. 683-687.
288. Peters, M., et al., *In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3575-3581.
289. Joyeux-Faure, M., *Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications?* J Pharmacol Exp Ther, 2007. **323**(3): p. 759-62.
290. Liu, X., et al., *Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion*. Life Sci, 2006. **78**(19): p. 2255-2264.
291. Villa, P., et al., *Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 971-975.
292. Kaushansky, K., *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3339-3347.
293. Schiødt, F., et al., *Thrombopoietin in acute liver failure*. Hepatology, 2003. **37**(3): p. 558-561.
294. Wolber, E. and W. Jelkmann, *Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(5): p. 499-506.
295. Ding, W. and X. Yin, *Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 445-454.
296. Thornberry, N. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-1316.
297. Green, D. and G. Kroemer, *Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?* J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2610-2617.
298. Canbay, A., et al., *Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1188-1198.
299. Baker, J., et al., *Human thrombopoietin reduces myocardial infarct size, apoptosis, and stunning following ischaemia/reperfusion in rats*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(1): p. 44-53.
300. Kluza, J., et al., *Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells*. Oncogene, 2004. **23**(42): p. 7018-7030.

301. Wang, S., et al., *Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways.* J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25535-25543.
302. Hofer, S., et al., *Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction.* Crit Care, 2009. **13**(3): p. R93.
303. Malhi, H., G. Gores, and J. Lemasters, *Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?* Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S31-S44.
304. Laster, S., J. Wood, and L. Gooding, *Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis.* J Immunol, 1988. **141**(8): p. 2629-2634.

9 DANKSAGUNG

Meiner Doktormutter Frau Professor Brigitte Vollmar möchte ich ganz besonders für ihre Unterstützung auf dem Weg zur Dissertation danken. Sie hat mir ermöglicht, an ihrem Institut zu promovieren, ihr fundiertes Fachwissen eingebracht, diskutiert, fachlichen Rückhalt gegeben und mir so den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten geebnet.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Christian Eipel möchte ich sehr danken. Er stand mir mit seiner großen Erfahrung immer mit Rat und Tat zur Seite. Er hat mich geduldig in das tierexperimentelle Modell eingearbeitet, viele fachliche Anregungen gegeben und bis zuletzt wesentlich die Fertigstellung der Arbeit begleitet.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem gesamten Team des Instituts für ihre hervorragende Unterstützung. Frau Berit Blendow, Frau Doris Butzlaff, Frau Dorothea Franz und Frau Maren Nerowski standen mir immer freundlich und hilfsbereit im Laboralltag mit ihrer technischen Assistenz zur Seite. Ebenso haben mich Frau Dr. Kerstin Abshagen, Herr Dr. Helmut Stein, Herr Dr. Heiko Sorg und Frau Anja Gellert unterstützt.

Meinen Mitdoktoranden gebührt ebenso Dank: sie haben die Stunden im Tier-OP, beim Auswerten im Institut und in der Unibibliothek durch Fachsimpeln und Gespräche verfliegen lassen.

Danken möchte ich auch Marc Hilgert und Paul Goebel, die mir durch ihre Software-Kenntnisse bei der Fertigstellung der Arbeit geholfen haben.

An dieser Stelle möchte ich mich auch sehr bei meinen Eltern bedanken. Meine Eltern haben mir das Medizinstudium ermöglicht und haben mir viel Kraft gegeben.

10 CURRICULUM VITAE

Aus Gründen des Datenschutzes wird in der elektronischen Ausgabe auf die Darstellung des Lebenslaufs verzichtet.

Publikation

Eipel C, Hardenberg J, Negendank S, Abshagen K, Vollmar B.. Thrombopoietin limits IL-6 release but fails to attenuate liver injury in two hepatic stress models.
Eur J Gastroenterol Hepatol. 2009; 21:923-31.

ANHANG

Thesen zur Dissertation

1. Die Leber besitzt eine Schlüsselfunktion im Stoffwechsel und in der Biotransformation des Organismus. Deshalb hat ein akutes Leberversagen besonders schwerwiegende Folgen für den Wirt.
2. Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der intensivmedizinischen supportiven Therapiestrategien ist es bisher nicht gelungen, die Prognose des akuten Leberversagens bei Patienten wesentlich zu verbessern. Spezifische Therapieansätze sind für die meisten Ätiologien des akuten Leberversagens nicht gegeben.
3. Für verschiedene pleiotrope Substanzen konnten experimentell direkte hepatoprotektive Eigenschaften beim akuten Leberversagen nachgewiesen werden. Da die Rolle des pleiotrop wirkenden Hormons Thrombopoetin (TPO), dem Hauptregulator der Megakaryopoese und der Thrombopoese, beim akuten Leberversagen bisher noch nicht untersucht wurde, ist dies in der vorliegenden Dissertation erfolgt.
4. Hierfür wurde ein Schädigungsmodell mit der gleichzeitigen Gabe von Galaktosamin (GalN) und Lipopolysaccharid (LPS) zur Auslösung eines septischen Leberschadens angewandt. Dieses mündet nach 8 Stunden in eine massive Leukozyteninfiltration in die Leber, in ein zunehmendes Versagen der hepatischen Mikrozirkulation und in eine schwere hepatozelluläre Nekrose.
5. Das akute Leberversagen weist pathophysiologisch deutliche Ähnlichkeiten zum septischen Schock in Bezug auf systemische Inflammation und Progression zum Multiorganversagen auf, weshalb sich das GalN/LPS-Modell hervorragend für die zu untersuchende Fragestellung eignete.

-
6. Die Leber der Versuchstiere wurde mit dem etablierten Verfahren der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie untersucht, um die Parameter sinusoidale Perfusion, Leukozyten-Endothel-Zell-Interaktion und die hepatozelluläre Apoptose zu analysieren.
 7. Biochemische, immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen von asservierten Plasma- und Gewebeproben dienten der Verifizierung der in-vivo-Parameter sowie der Bestimmung der Expression von c-mpl, dem Rezeptor von TPO.
 8. Die Gabe von GalN/LPS führte zu einem partiellen Ausfall der hepatischen Mikrozirkulation, zur intrahepatischen Akkumulation von Leukozyten und zur hepatozellulären Apoptose. Diese Beobachtungen konnten in gesunden, sham-operierten Tieren nicht nachgewiesen werden.
 9. Die vorherige Behandlung der Versuchstiere mit niedrig dosiertem TPO verminderte den Perfusionsschaden im Vergleich zu den unbehandelten mit GalN/LPS exponierten Versuchstieren leicht, konnte jedoch nicht die Anzahl sinusoidal stagnierender Leukozyten reduzieren. Die Gabe von hoch dosiertem TPO beeinflusste die mikrovaskulären Perfusionsausfälle nicht und führte sogar zu einer weiteren Zunahme der Anzahl intrahepatisch adhärenter Leukozyten.
 10. Die Gabe von niedrig dosiertem TPO 24 Stunden vor Induktion des akuten septischen Leberversagens beeinflusste das Ausmaß der hepatozellulären Apoptose nicht, hingegen schwächte hoch dosiertes TPO 24 Stunden vor Induktion des akuten septischen Leberversagens die Aktivierung von Caspase-3 geringfügig ab.
 11. Die Applikation der hohen TPO-Dosis unterdrückte den inflammations-induzierten Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration. Dies könnte ein Hinweis auf eine negative „Feedback“-Schleife von TPO auf die Ausschüttung von IL-6

sein. Des Weiteren zeigte sich, dass die Gabe von hoch dosiertem TPO zu einem verstärkten Anstieg der Transaminasen im Blut führte.

12. Trotz des Nachweises, dass der TPO-Rezeptor c-mpl auf den Hepatozyten beim septischen Leberversagen verstärkt exprimiert wird, konnte TPO nur eine untergeordnete Rolle in der Steuerung der hepatozellulären Apoptose zugeschrieben werden.
13. TPO besitzt im endotoxämischen Leberversagen keine hepatoprotektiven Eigenschaften. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur Wirkung des ähnlich strukturierten, hämatopoetischen Wachstumsfaktors Erythropoetin.
14. Das Verständnis der Regulationsmechanismen von TPO in der Leber könnte helfen, TPO auch bei anderen Krankheitsbildern effektiver einzusetzen. Den Mechanismus von TPO und IL-6 gilt es, in weiteren Untersuchungen im Zusammenhang aufzuarbeiten.

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Mannheim, den 20.6.2011

Jost Graf von Hardenberg