

AUS DEM RUDOLF-ZENKER-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE CHIRURGIE

DIREKTORIN: UNIV.-PROF. DR. MED. BRIGITTE VOLLMAR

LEBERSPEZIFISCHES BID-SILENCING SCHÜTZT VOR ACETAMINOPHEN-INDUZIERTEM LEBERSCHADEN IN DER MAUS

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

MAREIKE MAXA, GEB. AM 20.06.1991 IN SAARBRÜCKEN
AUS ROSTOCK

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004084

Gutachter:

Apl. Prof. Dr. rer. nat. Angela Kuhla

Universitätsmedizin Rostock, Institut für experimentelle Chirurgie

Prof. Dr. med. Georg Lamprecht

Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Innere Medizin

Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie

Prof. Dr. med. Uta Dahmen

Universitätsklinikum Jena, Klinik für Allgemein-, Viszeral und Gefäßchirurgie

Experimentelle Chirurgie

Tag der Einreichung: 18.10.2021

Tag der Verteidigung: 19.10.2022

**Für
Finian
und
Frederik**

1. INHALTSVERZEICHNIS

1.	Inhaltsverzeichnis	1
2.	Abkürzungen	5
3.	Abbildungsverzeichnis	7
4.	Zusammenfassung	9
5.	Einleitung	11
5.1	Definition, Epidemiologie und Ätiologie des Acetaminophen (APAP)-induzierten akuten Leberversagens (ALV)	11
5.2	Pathophysiologie des APAP-induzierten ALV	13
5.2.1	Metabolismus von APAP	13
5.2.2	Hepatische Mikrozirkulation beim APAP-induzierten ALV	15
5.2.3	Apoptose und Nekrose beim APAP-induzierten ALV	16
5.2.4	Inflammation beim APAP-induzierten ALV	20
5.3	Therapie des APAP-induzierten ALV	21
5.4	Ziele der Arbeit	24
6.	Material und Methoden	25
6.1	Versuchstiere	25
6.2	Prämedikation	25
6.2.1	Oligonukleotide	25
6.3	Tiermodell und experimentelles Protokoll	26
6.3.1	Anästhesie	27
6.3.2	Chirurgische Präparation	27
6.4	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)	28
6.4.1	Grundlagen der IVM	28
6.4.2	Hepatische Mikrozirkulation	30
6.4.3	Venuläres Leukozytenrolling und Leukozytenadhärenz	30
6.4.4	Sinusoidale Leukozytenstase	30
6.4.5	DNA-Fragmentierung	30
6.4.6	Auswertung der IVM-Parameter	31
6.5	Blut- und Gewebeentnahme	32
6.5.1	Blutbild und Plasmaasservierung	33
6.5.2	Bestimmung von AST, ALT, HMGB1 und CyPA	33

6.5.3	Molekularbiologische Analysen	33
6.5.3.1	Western Blot Analyse	33
6.5.3.2	Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) Analyse	34
6.5.4	Bestimmung der hepatischen GSH-Konzentration	35
6.5.5	Histologie: Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung	35
6.6	Statistik	36
7.	Ergebnisse	37
7.1	Bid- <i>Silencing</i> beim APAP-induzierten ALV	37
7.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	38
7.2.1	Hepatische Mikrozirkulation.....	38
7.2.2	Leukozyteninteraktionen.....	39
7.2.2.1	Venuläres Leukozytenrolling und Leukozytenadhärenz	39
7.2.2.2	Sinusoidale Leukozytenstase	40
7.2.3	DNA-Fragmentierung.....	41
7.3	Blut- und Gewebeentnahme	42
7.3.1	Molekularbiologische Analysen	42
7.3.1.1	Proteinexpression von cleaved Caspase 3, Bax und Bcl2	42
7.3.1.2	mRNA-Expression von <i>cyp2e1</i>	43
7.3.2	Bestimmung der hepatischen GSH-Konzentration	44
7.3.3	Bestimmung von AST und ALT	45
7.3.4	Bestimmung von HMGB1 und CyPA.....	45
7.3.5	Histologie: Nekroseareale.....	46
7.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
8.	Diskussion.....	49
8.1	Diskussion von Material und Methoden	49
8.1.1	Tiermodell und chirurgisches Vorgehen	49
8.1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM).....	50
8.1.3	Untersuchungsmethoden.....	50
8.2	Diskussion der Pathophysiologie des APAP-induzierten ALV	51
8.2.1	Mikrozirkulation.....	52
8.2.2	Inflammation	52
8.2.3	Apoptose und Nekrose	54

8.3	Diskussion des therapeutischen Potentials von Bid und siRNA beim APAP-induzierten ALV	56
8.3.1	SiRNA-Therapie und DBTC/siRNA ^{Bid} -Gabe beim APAP-induzierten ALV ..	56
8.3.2	Therapeutisches Potential des Bid- <i>Silencing</i> beim APAP-induzierten ALV ..	57
8.4	Zusammenfassung	61
9.	Thesen zur Dissertation	63
10.	Literaturverzeichnis	65
11.	Danksagung	83
12.	Publikation	85

2. ABKÜRZUNGEN

ALT	<i>Alanin Aminotransferase</i>
ALV	<i>Akutes Leberversagen</i>
APAP	<i>Acetaminophen, acetyl-para-aminophenol</i>
AST	<i>Aspartat Aminotransferase</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl	<i>B cell lymphoma</i>
Bcl2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
CYP	<i>Cytochrom P450</i>
CyPA	<i>Cytosolische peptidyl-prolyl cis–transisomerase, Cyclophilin a</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DBTC	<i>Ein von Silence Therapeutics entwickelter Zusatz, der explizit die Leber anspricht</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GSH	<i>Glutathion</i>
H&E	<i>Hämatoxylin & Eosin</i>
HE	<i>Hepatische Enzephalopathie</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, verwendet als Puffer in den Kontrollgruppen mit PBS- oder APAP-Applikation</i>
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IVM	<i>Intravitalfluoreszenzmikroskopie</i>
LPO	<i>Lipidperoxidation</i>
Luci	<i>Luciferase</i>
MPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
NAC	<i>N-Acetylcystein</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NAPQI	<i>N-Acetyl-p-benzochinonimin</i>
OTC	<i>Over the Counter</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SEC	<i>Sinusoidale Endothelzellen</i>
SiRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>

3. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ätiologie des akuten Leberversagens (ALV)	11
Abbildung 2: Abbauwege des Acetaminophens (APAP)	14
Abbildung 3: Darstellung der unterschiedlichen Apoptosewege	17
Abbildung 4: Versuchskinetik	26
Abbildung 5: Instrumentenansicht der benötigten Utensilien	27
Abbildung 6: Vorbereitungen zur Präparation der Vena jugularis externa	28
Abbildung 7: Darstellung des Mikroskops sowie des Versuchstieres	29
Abbildung 8: Darstellung des PC Arbeitsplatzes	31
Abbildung 9: Die zur Blut- und Gewebeentnahme benötigten Utensilien	32
Abbildung 10: Repräsentative Abbildungen des Leberparenchyms	36
Abbildung 11: Repräsentativer Western Blot (A) und quantitative Auswertung des BH3- interacting domain death agonist (Bid) (B)	37
Abbildung 12: Quantitative Analyse der hepatischen mRNA-Expression des BH3- interacting domain death agonist (<i>bid</i>)	38
Abbildung 13: Quantitative Analyse der sinusoidalen Perfusion	39
Abbildung 14: Quantitative Analyse der rollenden vs. fließenden Leukozyten in den Lebervenolen (A) sowie venulär adhärenter Leukozyten (B)	40
Abbildung 15: Quantitative Analyse der adhärenter Leukozyten in den Lebersinusoiden mit repräsentativen intravitalmikroskopischen (IVM)-Aufnahmen	41
Abbildung 16: Quantitative Analyse von Hepatozyten mit DNA-Fragmentierung	42
Abbildung 17: Repräsentatives Bild der <i>cleaved</i> Caspase 3 Expression	42
Abbildung 18: Repräsentative Western Blot Bilder und quantitative Analyse der hepatischen Proteinexpression von <i>Bcl-2-associated X</i> (Bax) (A) und <i>B-cell lymphoma 2</i> (Bcl2) (B)	43
Abbildung 19: Quantitative RT-PCR Analyse der hepatischen <i>cyp2e1</i> mRNA-Expression	44
Abbildung 20: Quantitative Bestimmung der GSH-Konzentration	44
Abbildung 21: Plasmakonzentrationen von ALT und AST	45
Abbildung 22: Plasmakonzentrationen von HMGB1 (links) und von CyPA (rechts)	46
Abbildung 23: Quantitative Analyse von nekrotischen Gewebearealen	47

4. ZUSAMMENFASSUNG

Acetaminophen (APAP)-induziertes akutes Leberversagen (ALV) ist eine lebensbedrohliche Krankheit mit nur wenigen Behandlungsmöglichkeiten. Obwohl seit mehr als 40 Jahren umfangreiche Forschung betrieben wird, sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen bisher nicht vollständig geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob APAP-induziertes ALV bei Mäusen vermindert werden kann, indem der BH3-interagierende *Domain Death Agonist* (Bid) als potenzieller Schlüsselfaktor im APAP-Metabolismus ausgeschaltet wird. Für die Unterdrückung der Bid-Expression bei Mäusen wurde die small interfering ribonucleic acid^{Bid} (siRNA^{Bid}) mit dem leberspezifischen siRNA-Zustellungssystem DBTC versehen und 48 Stunden vor der APAP-Exposition verabreicht. Mäuse, die mit dem Puffer 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (DBTC/vehicle^{HEPES}) und DBTC/siRNA^{Luci} vorbehandelt wurden, dienten als siRNA-Kontrollen. Die Auswirkungen der verschiedenen Expositionen wurden sechs Stunden nach APAP- oder PBS-Exposition mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie, Molekularbiologie, Histologie und Laboranalyse untersucht. Die Anwendung von DBTC/siRNA^{Bid} führte zu einem signifikanten Rückgang der mRNA- und Proteinexpression von Bid in APAP-exponierten Mäusen. *Off-Targets*, wie Cytochrom P450 (CYP) 2E1 und Glutathion (GSH), die unter APAP-Intoxikation verbraucht werden, wurden bei allen APAP-exponierten und PBS-behandelten Mäusen vergleichsweise reduziert bzw. blieben auf einem gleichen Niveau, was die Spezifität des Bid-*Silencing* unterstreicht. Durch das Bid-*Silencing* bei APAP-exponierten Mäusen blieb die Inflammation mit Leukozyteninfiltration nahezu unbeeinflusst, während sich die Perfusionsstörung leicht verbesserte ohne dabei Normalwerte zu erreichen. Bid-*Silencing* reduzierte jedoch enorm den hepatozellulären Schaden, was durch einen starken Rückgang der Zellzahl mit Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmentierung bei APAP-exponierten Mäusen deutlich wurde. Bei diesen Mäusen wurde auch die Expression des proapoptotischen *Bcl-2-associated X* (Bax)-Proteins, das in jüngster Zeit an Bedeutung bei der regulierten Nekrose gewonnen hat, signifikant reduziert. Dies wurde durch einen Rückgang sowohl des nekrotischen Lebergewebes als auch der Plasma-Transaminase-Aktivität bei fehlender Caspase 3 Aktivität untermauert. Darüber hinaus war die Plasmakonzentration von *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1), einem Marker für u.a. Nekrose, signifikant gesunken. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das leberspezifische Bid-*Silencing* die APAP-exponierten Mäuse bedingt vor mikrozirkulatorischer Dysfunktion sowie Inflammation schützt und den hepatischen Leberschaden durch signifikant reduzierte DNA-Fragmentierung der Zellen wie auch der Nekroseareale stark vermindert. Diese Arbeit trägt zum Verständnis des molekularen Mechanismus des APAP-induzierten pathogenen Signalweges bei, indem sie die Bedeutung der mit Bid und insbesondere der mit leberspezifischem Bid-*Silencing* verbundenen Effekte untermauert.

5. EINLEITUNG

5.1 DEFINITION, EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE DES ACETAMINOPHEN (APAP)-INDUZIERTEN AKUTEN LEBERVERSAGENS (ALV)

Das akute Leberversagen (ALV) in den USA wird von Koch et al. 2017 als schwere Hepatopathie (Transaminasenerhöhung) mit Lebersynthesestörung (Ikterus und Koagulopathie mit International Normalized Ratio (INR) $>1,5$) definiert. Hierbei muss zusätzlich eine hepatische Enzephalopathie (HE) vorliegen, während weitere präexistente Lebererkrankungen oder sekundäre Ursachen (z. B. Sepsis, kardiogener Schock) ausgeschlossen werden müssen (Koch et al., 2017; Canbay et al., 2011; Rutter et al., 2019). Laut Canbay et al. 2011 gibt es noch keine klare und allgemein gültige Definition eines ALV für Deutschland oder die EU. Die amerikanische „*Acute Liver Failure Study Group*“ unterscheidet aber drei Stadien des ALV. Sie spricht von einem hyperakuten (<7 Tage), einem akuten (7-28 Tage) und einem subakuten (28 Tage-6 Monate) Leberversagen. In Deutschland werden jährlich um die 200-500 Fälle mit ALV diagnostiziert, wobei Frauen etwas häufiger betroffen sind als Männer (Hadem et al., 2008; Canbay et al., 2011). Während in Schwellenländern vermehrt virale Ursprünge für ein ALV ursächlich sind, ist in Industrienationen APAP (Acetaminophen)-induziertes ALV keine Seltenheit (siehe Abbildung 1).

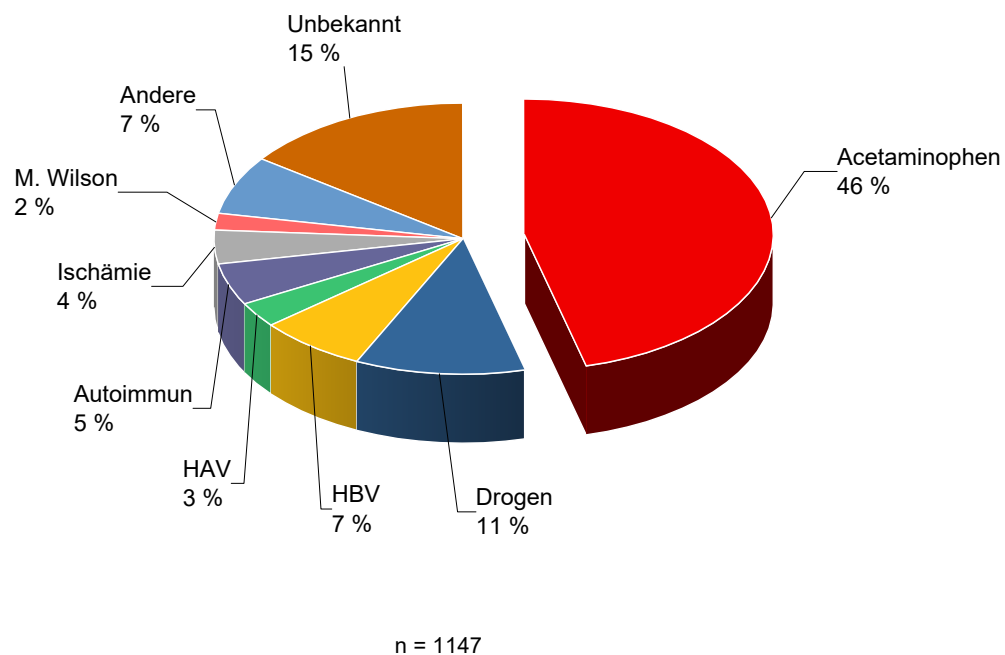


Abbildung 1: Ätiologie des akuten Leberversagens (ALV) bei 1147 erwachsenen Patienten, die zwischen Januar 1998 und Juli 2007 in die Datenbank der amerikanischen ALV-Studiengruppe aufgenommen wurden (mod. nach Lee et al., 2008). HAV: Hepatitis A Virus; HBV: Hepatitis B Virus.

Dies zeigt sich auch in anderen westlichen Ländern, beispielsweise werden in den USA APAP-Intoxikationen mit über 40% als Hauptgrund für ALV angegeben (siehe Abbildung 1) (Lee, 2004; Larson et al., 2005; Fontana, 2008; Reuben et al., 2010; Bernal und Wendon, 2013).

APAP wurde erstmals in den USA verschreibungspflichtig 1955 verkauft (Lee, 2004). Bereits kurze Zeit später gab es schon *over the counter* (OTC)-Tabletten in unterschiedlicher Dosierung. Es wurde davon ausgegangen, dass keine schwerwiegenden Nebenwirkungen vorhanden waren (Lee, 2004). Darum haben in den letzten Jahrzehnten die durch APAP-verursachten toxischen Leberschädigungen stark an Präsenz gewonnen. Auch heute findet APAP noch eine breite Anwendung, so verkaufen sich in den USA jährlich über 25 Milliarden Dosen. Obwohl mittlerweile die Nebenwirkungen bekannt sind, werden diese oft nicht genügend beachtet (Abourbih et al., 2016). Die bekannteste hierbei ist die Hepatotoxizität, die letztendlich in einem ALV enden kann (Davidson und Eastham, 1966; Makin und Williams, 1997). Für Deutschland gibt es aktuell keine genauen Daten, allerdings meldete das Giftinformationszentrum (GGIZ) der Länder Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen Anfang 2012, dass es trotz der Begrenzung der maximalen (OTC)-Abgabemenge nahezu unverändert häufig zu Vergiftungen und schweren Leberschäden unter APAP kommt (Giftnotruf Erfurt fordert Rezeptpflicht für Acetaminophen. Deutsche Apotheker Zeitung, Meldung vom 28. Dezember 2011). Zwei Studien, die in Nordwestdeutschland Fälle eines ALV untersuchten, zeigten, dass die Nebenwirkungen von APAP auch in Deutschland nicht zu unterschätzen sind (Hadem et al., 2008; Canbay et al. 2009). Hierbei wurde jeweils in circa 16% der Fälle das ALV durch APAP induziert (Canbay et al., 2009).

APAP, welches oft auch als Paracetamol bezeichnet wird, ist ein hinlänglich bekanntes Schmerz- und Fiebertmittel und wird von Personen aller Altersklassen im Bedarfsfall angewendet. Es ähnelt vom Aufbau her den *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs), jedoch hat APAP eine geringere antiinflammatorische Wirkung als typische NSAIDs wie beispielsweise Ibuprofen und auch eine schwächere Wirkung auf die Gewebe-Cyclooxygenase Aktivität (Bertolini et al., 2006). Daher wird APAP der Gruppe der Nichtopioid-Analgetika zugeordnet. Die analgetische Wirkung von APAP kommt durch eine zentrale Anhebung der Schmerzschwelle zustande (Bertolini et al., 2006).

APAP gilt heutzutage als ein beliebtes Medikament bei leichten-mittleren Schmerzen jeder Art, ebenso bei Fieber (Black, 1980; Larson et al., 2005). Vor allem bei Kindern wird es gerne aufgrund der guten Studienlage verabreicht (Abourbih et al., 2016). APAP wird weltweit oft als Kombipräparat mit anderen Wirkstoffen gemeinsam eingesetzt und führt hierbei schnell zu einer ungewollten und chronischen Überdosierung (Lancaster et al., 2015). Bei Erwachsenen liegt die Schwelle bei 10-15 g bei einmaliger Einnahme (Makin

und Williams, 1997; Larson, 2007). Oft sind bei höheren Einzeldosen suizidale Absichten ursächlich. Diese sind auch die am meisten vorkommenden APAP-Intoxikationen mit nachfolgendem ALV. Seltener kommt es auch zu unbeabsichtigter Einnahme mehrerer Tabletten (Lee, 2004). Aufgrund der doch oft unterschätzten Risiken wurde APAP ab Mengen von 10 g in Deutschland seit April 2014 wieder verschreibungspflichtig, eine generelle Rezeptpflicht wurde bisher aber nicht eingeführt. Grundsätzlich sollte die therapeutische Dosierung 4 g innerhalb von 24 h nicht überschreiten, wobei die Schwelle für leberschädigende Nebenwirkungen bei Kindern bereits bei 150 mg/kg Körpergewicht (KG) liegt (Abourbih et al., 2016). Jedoch ist eine Hepatotoxizität schon bei wesentlich geringeren Dosen möglich, wenn weitere Faktoren das Risiko steigern. Hierzu gehören u.a. das Alter, Alkoholabusus, Komorbiditäten, Komedikation, genetische Faktoren und auch das Fasten (Lee, 2004). Neben diesen zu berücksichtigenden Faktoren sind besonders der Pathomechanismus und die Art des Zelltodes für potentielle Therapieansätze beim APAP-induzierten ALV entscheidend.

5.2 PATHOPHYSIOLOGIE DES APAP-INDUZIERTEN ALV

Obwohl seit über 40 Jahren am APAP-induzierten ALV geforscht wird, ist der genaue Wirk- und Pathomechanismus nicht vollends verstanden (Jaeschke et al., 2019).

5.2.1 METABOLISMUS VON APAP

Medikamente, bzw. von außen zugeführte Stoffe, wie auch das APAP werden in der Leber über die Biotransformation verstoffwechselt. Als Substrate fungieren körpereigene und körperfremde Stoffe wie beispielsweise Arzneimittel. Die Biotransformation der Leber lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen. In der Phase I werden polare Gruppen an das Medikament/den Metaboliten angehängt. Dies geschieht über chemische Reaktionen wie Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse. Neben der Aktivierung vieler Metaboliten können ebenso auch toxische Beiprodukte wie freie Radikale entstehen. Während Phase II werden die Moleküle dann mit Glukuronsäure, Sulfaten oder Gluthathion (GSH) mithilfe der UDP-Glukuronyltransferasen, Sulfotransferasen und der GSH-S-Transferase konjugiert (siehe Abbildung 2) und damit für die Ausscheidung über die Galle oder die Nieren vorbereitet (Larson, 2007).

Trotz umfangreicher Forschung ist der Metabolismus von APAP bis heute nicht vollständig geklärt (Nelson, 1990; Adams et al., 2001; Jaeschke und Lemasters, 2003; Reid et al., 2005; Jaeschke und Bajt, 2006; Yan et al., 2010; Jaeschke et al., 2012a). Bekannt ist, dass APAP in therapeutischen Dosen größtenteils dem Phase II Stoffwechselweg der Leber zugeführt und dann in die Gallenblase ausgeschieden wird (Larson, 2007). Weitere 2 % des APAP werden unverändert in den Urin ausgeschieden (Larson, 2007). Die

verbleibenden 5-10 % des APAP werden über Phase I Reaktionen, wie bspw. der Oxidation zu geringen Mengen *N*-Acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) abgebaut. Hierzu werden die Cytochrom P450 (CYP)-Enzyme, eine Familie von membrangebundenen Hämproteinen mit enzymatischer Aktivität, benötigt (Hasler et al., 1999), wobei insbesondere das CYP2E1 (Rumack, 2002) relevant ist. Lokalisiert sind die CYP-Proteine in allen Zellen, vermehrt kommen sie in der Leber vor, wo sie am glatten endoplasmatischen Retikulum in zentrolobulären Hepatozyten lokalisiert sind (Tydén et al., 2014). In der anschließenden Phase II Reaktion entsteht durch Konjugation mit GSH ein wasserlösliches Produkt, welches dann über die Gallenblase ausgeschieden wird (Jaeschke und Bajt, 2006). Wird nun die therapeutische Dosis des APAP überschritten, kommt es leicht zu einer Übersättigung des Phase II Metabolisierungsweges in der Leber (siehe Abbildung 2) (Larson, 2007). Durch ein Überangebot des APAP-Metaboliten NAPQI entleeren sich der nur limitierte, zytosolische wie auch der mitochondriale GSH-Speicher. In Abwesenheit von GSH funktioniert die Detoxifikation der Leber nicht mehr ausreichend, NAPQI akkumuliert und bindet sich kovalent insbesondere an mitochondriale Proteine (Tirmenstein und Nelson, 1989; Jaeschke und Lemasters, 2003; James et al., 2003; Jaeschke, 2015; Hu et al., 2015).

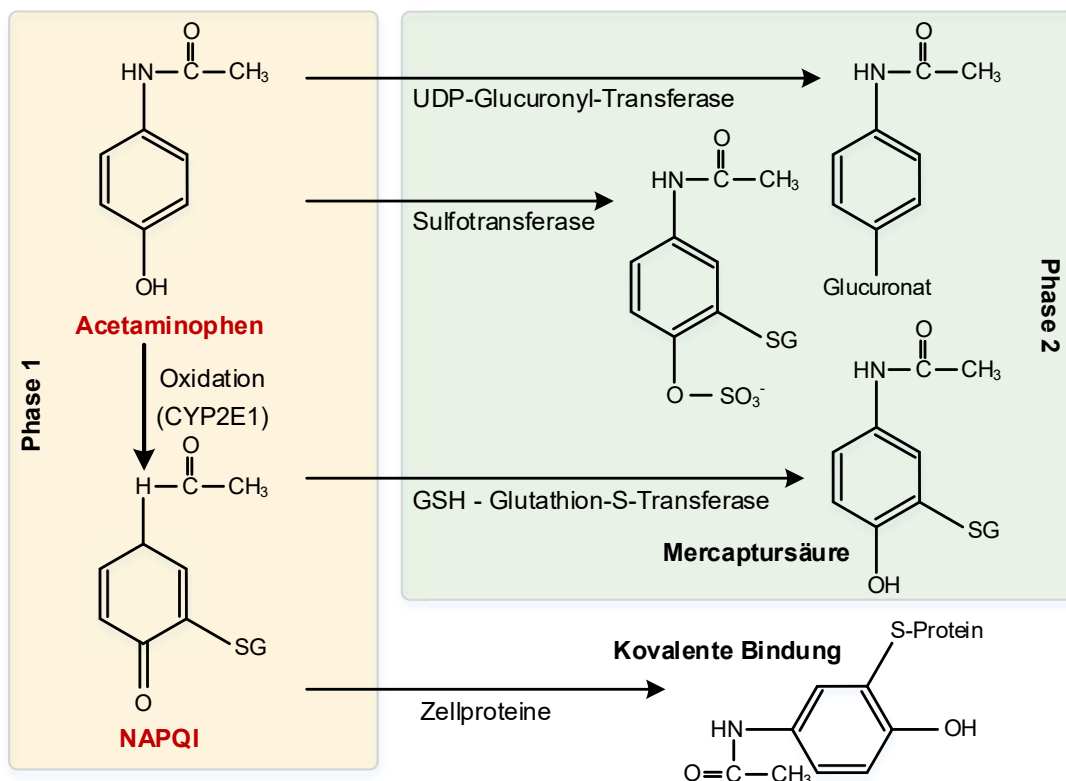


Abbildung 2: Abbauweg des Acetaminophens (APAP). Im Rahmen der Biotransformation erfolgt der Abbau von Metaboliten über Phase I - (gelb hinterlegte Fläche) und Phase II - Reaktionen (grün hinterlegte Fläche). Über letztere werden normalerweise 90% des APAP verstoffwechselt. Über CYP2E1 werden circa 5-10% des APAP in *N*-Acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) umgewandelt. Dieses wird durch Glutathion (GSH) zu Mercaptursäure, die dann in die Galle ausgeschieden wird, abgebaut. Bei unzureichenden GSH-Konzentrationen akkumuliert NAPQI und geht eine kovalente Bindung mit anderen Zellproteinen ein.

Es bilden sich NAPQI-Protein-Komplexe (Nelson, 1990; Cohen und Khairallah, 1997), die zur Dysfunktion der Mitochondrien führen (Jaeschke et al., 2013; McGill et al., 2013) und so zur Hepatotoxizität beim APAP-induzierten ALV beitragen.

Diese Leberschädigung kann durch weitere Faktoren abgeschwächt oder verstärkt werden. Bezüglich des Alters sind bspw. Kinder unter fünf Jahren weniger anfällig für die Hepatotoxizität, da sie noch nicht so viel des toxischen Metaboliten NAPQI bilden, dafür aber mehr konjugieren können, während Personen über dem 40. Lebensjahr risikobehafteter für ein ALV sind (Schmidt, 2005). Ebenfalls ist die Genetik von Bedeutung. So führen Polymorphismen in den CYP Enzymen zu einer Veränderung der Metabolisierung von APAP. Die klinische Relevanz dessen ist bisher aber noch nicht ausreichend evaluiert (Larson, 2007). Eine höchst kritische Kombination stellt APAP in Verbindung mit chronischem Alkoholkonsum dar. Chronischer Alkoholkonsum verändert die CYP-Aktivität, insbesondere die von CYP2E1, welches besonders im Stoffwechsel von APAP involviert ist. Dies kann bis zu zehn Tage, auch bei Abstinenz in dieser Zeit, anhalten. Außerdem entleert chronischer Alkoholkonsum die GSH-Speicher und hemmt die GSH-Synthese. Dies kann schon bei therapeutischen Dosen zu einer schweren oder fatalen Leberschädigung führen (Larson, 2007; Zimmermann et al., 2012). Ein weiterer Punkt ist der Ernährungszustand. Fasten führt zu einer Leerung der GSH-Speicher und einer CYP2E1-Induktion (Larson, 2007). Diese Gefahr potenziert sich, wenn zusätzlich chronisch Alkohol konsumiert wird. Chronische Lebererkrankungen ohne begleitenden Alkoholkonsum erhöhen grundsätzlich nicht das Risiko der Nebenwirkungen von APAP, jedoch ist dies auch abhängig davon, ob die GSH-Konzentrationen im Rahmen der chronischen Lebererkrankung ansteigen oder abfallen. Neben dem Metabolismus des APAP sind weitere pathophysiologische Parameter beim APAP-induzierten ALV zu beachten.

5.2.2 HEPATISCHE MIKROZIRKULATION BEIM APAP-INDUZIERTEN ALV

Charakteristisch beim APAP-verursachten ALV ist die mikrozirkulatorische Dysfunktion (Ito et al., 2003). Besonders betroffen vom Perfusionsdefizit sind die Lebersinusoiden (Vollmar und Menger, 2009). Dies sind erweiterte Kapillargefäße in der Leber, welche das nährstoffreiche Blut aus der Pfortader (Vena interlobularis) und das sauerstoffreiche Blut aus der Leberarterie (Arteria interlobularis) zur Zentralvene des Leberläppchens transportieren. Bereits in anderen Studien wurde gezeigt, dass eine direkte APAP-Toxizität neben den Hepatozyten auch bei den sinusoidalen Endothelzellen (SEC) auftreten kann (Ito et al., 2003; DeLeve et al., 1999) und so schon im frühen Stadium der APAP-Intoxikation, vor der Ausbildung nekrotischer oder apoptotischer Areale, zu einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion führen kann (Ito et al., 2003). Während bereits 0,5-1 h

nach APAP-Intoxikation geschwollene SEC auftreten, haben Ito et al. 2003 zu diesem Zeitpunkt weder betroffene Hepatozyten noch erhöhte Transaminasenwerte feststellen können. Zudem kommt es zu Defekten in den Zellmembranen von SEC, woraufhin sich Thrombozyten anheften und es zum Übertritt und der Ansammlung von Erythrozyten in den extrasinusoidalen Raum kommt (Ito et al., 2003; Walker et al., 1985). Ebenfalls werden bereits Makrophagen aktiviert (Laskin et al., 2009). All dies führt aufgrund der Größe und Architektur der Lebersinusoide zu Vasokonstriktion, Ödembildung sowie verlangsamtem Blutfluss (Ito et al., 2003). Es entsteht ein Perfusionsdefizit, welches um die Zentralvene am stärksten ausgeprägt ist (Tanaka et al., 2014). In der Folge kommt es zu einem Absterben der Hepatozyten, sei es durch apoptotische oder nekrotische Zelluntergänge.

5.2.3 APOPTOSE UND NEKROSE BEIM APAP-INDUZIERTEN ALV

Bis heute ist noch nicht endgültig geklärt, welche Form des Zelltodes bei durch APAP-verursachter Hepatotoxizität überwiegt. Obwohl der durch APAP-induzierte Zelltod weitgehend als eine Unterform der Nekrose beschrieben wird (Burcham und Harman, 1991; Cover et al., 2005; Jaeschke et al., 2011b; 2012a), behaupten andere Studien, dass Apoptose ebenfalls auftritt (Ray und Jena, 2000; El-Hassan et al., 2003).

Die Apoptose ist ein von der Zelle selbst programmierter Zelltod, bei dem kein umliegendes Gewebe geschädigt wird. Sie ist charakterisiert durch ATP-abhängige biochemische Mechanismen und sichtbare morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfen, DNA-Fragmentierung und Membranaufkeimung (Elmore, 2007). APAP-induzierte Apoptose ist separiert in zwei Hauptwege, den Todesrezeptor-abhängigen oder extrinsischen Weg und den Mitochondrien-abhängigen oder intrinsischen Weg (Zimmermann et al., 2001; Elmore, 2007; Kon et al., 2007).

Beim extrinsischen Weg bindet ein Ligand an einen zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie gehörenden Rezeptor (Abbildung 3), wodurch über sogenannte Todes-Rezeptoren ein Absterben der Zelle initiiert wird (Hikita et al., 2011; Guha et al., 2007). Der intrinsische oder mitochondriale Weg (Abbildung 3), welcher hauptsächlich beim APAP-induzierten Leberschaden auftritt, wird durch intrazelluläre Signale ausgelöst, wodurch es zu DNA Schäden kommt. Durch DNA Schäden, oxidativen Stress oder Änderungen der Kalziumhomöostase wird eine mitochondriale Dysfunktion initiiert.

Die *B-cell-lymphoma* (Bcl)-Proteinfamilie, wozu auch das *Bcl-2-associated X* (Bax)-Protein und das *BH3-interacting-domain death agonist* (Bid)-Protein gehören, regulieren die Apoptose vor allem über den mitochondrialen Weg. Hierbei wird die Bedeutung von Protease-gespaltenem Bid historisch betrachtet erstmals für die Weiterleitung des apoptotischen Signals in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose deutlich (Li et al., 1998). Das weitaus potentere durch Caspase 8 gesplattene Bid (tBid) wird zum Mitochondrium

verlagert und führt dort über verschiedene äußere Einflüsse und Mediatoren, unter anderem durch das Protein Bax, zu oxidativem Stress bspw. durch Cytochrom c Freisetzung (Gross et al., 1999). Die Caspaseaktivität wird hierbei über Cytochrom c, welches wiederum über pro- oder antiapoptotische Proteine der Bcl-Familie aktiviert wird, reguliert (Gross et al., 1999). Diese Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges führt dann über eine Permeabilitätsänderung der äußeren Mitochondrienmembran zu einer Verstärkung und Weiterleitung des apoptotischen Signals (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Daher wurde zunächst vor allem der apoptotische Zelltod mit Bid in Verbindung gebracht. Bestätigt wurde dies in *Bid-knock-out* Mäusen, deren Hepatozyten im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren auf Fas-Stimulation unter anderem nicht mit Cytochrom c Freisetzung reagierten, keine Effektorcaspasen aktivierten und deshalb überlebten (Yin et al., 1999).

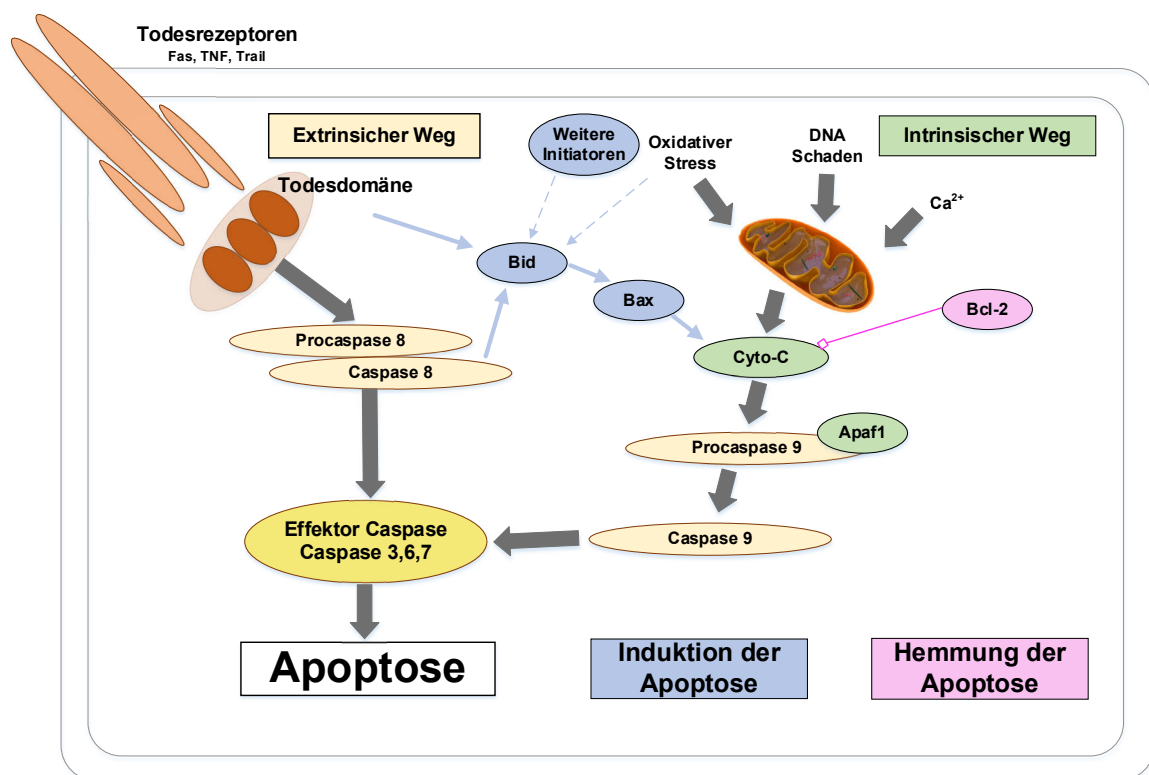


Abbildung 3: Darstellung der unterschiedlichen Apoptosewege. Wird der extrinsische Weg über Todesrezeptoren beschritten (gelb), kommt es durch eine Caspase Aktivierung zur Apoptose. Beim intrinsischen Weg (grün) lösen intrazelluläre Signale wie bspw. oxidativer Stress eine mitochondriale Dysfunktion aus, welche über Cytochrom c Ausschüttung und Caspase Aktivierung durch Mitglieder der Bcl-Proteinfamilie zur Apoptose führen. Weiterhin ist beim intrinsischen Weg durch unterschiedliche Regulationsmechanismen sowohl eine Induktion (blau) wie eine Hemmung (rosa) der Apoptose möglich (ergänzt nach Felderhoff-Müser, 2004).

Dieser bereits erwähnte Weg der Bid-Aktivierung um apoptotische Signale weiterzuleiten ist der Bekannteste (Wei, 2001; Cartron et al., 2004; Kim et al., 2006). Jedoch sind bis heute die molekularen Ereignisse, die zu APAP-induziertem mitochondrialem oxidativen Stress führen, nicht genau bekannt (Jaeschke et al., 2012a).

Neuere Studien postulieren eine Beteiligung weiterer Zelltodmechanismen bei der Bid-Aktivierung (Irrinki et al., 2011; Whelan et al., 2012; Karch et al., 2013; Karch und

Molkentin, 2015). Es wird vermutet, dass Bid periphere Signale durch direkte oder indirekte Mechanismen weiterleitet (Lutter et al., 2000; Scorrano et al., 2002; Willis und Adams, 2005; Soriano und Scorrano, 2011) und auch durch andere Pathomechanismen, wie bspw. Mitochondrien-assoziierten oxidativen Stress, aktiviert werden kann (Karch und Molkentin, 2015) (siehe Abbildung 3). Die genauen Mechanismen sind an diesem Punkt noch nicht vollständig erforscht (Jaeschke et al., 2011a; 2011b; 2012a). Es wurde aber bereits in Studien belegt, dass eine proteolytische Aktivierung von Bid nach APAP-Exposition (Badmann et al., 2011; 2012) stattfindet, sodass das Bid-Protein aufgrund des hier genannten Wirkmechanismus beim durch APAP-bedingten ALV berücksichtigt werden sollte.

Ursprünglich wurde angenommen, dass der oxidative Stress bei APAP-Intoxikationen zur Apoptose führt, jedoch zeigte sich *in vivo* keine Caspase-Aktivierung (Gujral, 2002), welche als eines der Hauptmerkmale der Apoptose gilt. Fraglich bleibt also, ob Apoptose alleine für den APAP-verursachten Zelltod verantwortlich sein kann (Sasaki et al., 2000; Ferret, 2001; Jaeschke, 2002) oder noch weitere Formen des Zelltodes wie bspw. Nekrose auftreten.

Während die Apoptose als kontrollierte Form des Zelltodes bekannt ist, stellt die Nekrose historisch betrachtet eine unkontrollierte Form des Zelltodes mit Zerstörung des Gewebes mit einer nachfolgenden Entzündungsreaktion des umliegenden Parenchyms dar (Karch und Molkentin, 2015). Allerdings haben bereits Studien zeigen können, dass unter bestimmten Bedingungen Nekrose auch eine regulierte Form des Zelltodes in erwachsenen Wirbeltierorganismen sein kann (Karch und Molkentin, 2015). „Regulierte Nekrose ist definiert als Caspase-unabhängiger Zelltod, der alle morphologischen Merkmale der klassischen Nekrose aufweist, aber durch Beeinflussung einer oder mehrerer molekularer Schlüsselkomponenten gehemmt oder beschleunigt werden kann“ (Karch und Molkentin, 2015). Grundsätzlich ist die Nekrose durch Zell- und Organellschwellung, frühe Plasmamembranruptur und das Ausschütten von zellulärem Material in das umliegende Gewebe mit anschließender Entzündungsreaktion definiert (Majno und Joris, 1995). Gleichfalls kommt es zu einem Kalziumanstieg im Zytoplasma (Meyers et al., 1988; Jaeschke, 1990; Jaeschke und Lemasters, 2003). Diese veränderte Kalziumhomöostase führt durch eine erhöhte Zellpermeabilität zur Bläschenbildung in der Zellmembran und einem Verlust der Membranintegrität (Lee, 1995), was wiederum u.a. die mikrozirkulatorische Dysfunktion verstärken kann. Es kommt zum DNA Schaden und zur intrazellulären Proteinmodifikation. Besonders betroffen ist hierbei das Mitochondrium. Während bei der Apoptose Caspasen und Nukleasen durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-Proteinfamilie wie bspw. Bax zu mitochondrialer Dysfunktion führen, wird diese bei der Nekrose über freie Sauerstoffradikale, einen Verlust der ATP-Produktion und u.a. ein

Öffnen der *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) ausgelöst. Durch die nun erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran entsteht eine mitochondriale Dysfunktion, welche letztendlich dann zum nekrotischen Zelltod führt. Dieser ist, genauso wie die Apoptose, vor allem zentrolobulär angeordnet, da hier die höchsten Konzentrationen von CYP2E1 herrschen und damit die höchste Produktion an NAPQI stattfindet.

Die Apoptose und die Nekrose sind aber nicht klar voneinander zu trennen (Sasaki et al., 2000; Ferret, 2001; Jaeschke, 2002). So sind Merkmale der Apoptose wie Cytochrom c Freisetzung und DNA-Fragmentierung ebenso bei der Nekrose zu finden (Bajt et al., 2006; Jaeschke et al., 2012a). Außerdem wurde eine massive Freisetzung des *High Mobility Group Protein B1* (HMGB1) (Ramachandran und Jaeschke, 2018) und des Cyclophilin A (CyPA, *cytosolische peptidyl-prolyl cis-transisomerase*) (Nigro et al., 2013; Naoumov, 2014) als weitere Nekroseparator bei APAP-verursachter Hepatotoxizität beschrieben. Die Menge des nekrotischen Gewebes korreliert dabei mit der HMGB1-Aktivität (Ramachandran und Jaeschke, 2018).

Basierend auf der aktuellen Literatur zeigt der APAP-induzierte hepatische Zelltod weder eine klassische Apoptose noch eine klassische Nekrose (Dixon et al., 2012, Vandenabeele et al., 2010). Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass ein Leberschaden nach einer APAP-Intoxikation durch eine Form der programmierten bzw. regulierten Nekrose zustande kommt (Jaeschke et al., 2019). Hierbei wird u.a. von onkotischer Nekrose, Nekroptose, Ferroptose und Pyroptose gesprochen (Jaeschke et al., 2019, Shojaie et al., 2020). Durch die starke Zellschwellung und die Freisetzung von Zellproteinen wurde die Art des Zelltods bei APAP-Hepatotoxizität früher als onkotische Nekrose bezeichnet (Gujral, 2002). Aufgrund der Komplexität der Signalwege, die an der Initiierung, Verstärkung und Ausbreitung des oxidativen Stresses innerhalb der Zelle beteiligt sind, wurde der Begriff aber in programmierte bzw. regulierte Nekrose geändert (Jaeschke et al., 2019).

Eine spezifischere Form der regulierten Nekrose ist die Nekroptose (Tang et al., 2019). Sie ist die bekannteste und am ausführlichsten untersuchte Unterform der regulierten Nekrose. Nekroptose wurde erstmals beschrieben als eine Verschiebung des Zelltodmodus von Apoptose zu Nekrose bei einer Stimulation der Todesrezeptoren mittels TNF in Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren (Vercammen et al., 1998). Hierbei kommt es durch Aktivierung unterschiedlicher Gene letztendlich zum Zelltod. Eine entscheidende Rolle dieser Genaktivierungen konnte beim APAP-induzierten Zelltod aber nicht verlässlich nachgewiesen werden (Dara et al., 2015; Jaeschke et al., 2019).

Pyroptose ist definiert als inflammatorische Form der programmierten Nekrose (Bergsbaken et al., 2009; Jorgensen et al., 2017). Obwohl Inflamationsreaktionen unter

APAP-Toxizität beschrieben sind, wird diese Form des Zelltodes ebenfalls als unwahrscheinlich eingeordnet, da einige Hauptmerkmale der Pyroptose bei APAP-Intoxikation nicht bzw. nur gering vorhanden sind (Williams et al., 2010a; Zhang et al., 2017, Shojaie et al., 2020). Die Ferroptose gilt als eine neue Form des Zelltods, die in verschiedenen Zellen einschließlich Hepatozyten auftreten kann (Lei et al., 2019; Jaeschke et al., 2019). Die Ferroptose erfordert u.a. eine Eisenmobilisierung und die Inaktivierung der Glutathionperoxidase 4, die spezifisch Phospholipidhydroperoxide reduziert und die Lipidperoxidation (LPO) verhindert (Lei et al., 2019). Unter APAP-Intoxikation gibt es aber keine Hinweise darauf, dass LPO quantitativ ausreicht, um den Zelltod zu verursachen (Jaeschke et al., 2019). Somit wird die APAP-Hepatotoxizität ebenfalls nicht durch Ferroptose verursacht (Jaeschke et al., 2019; Jaeschke et al., 2021). Wahrscheinlich bleibt aber, dass es sich weiterhin bei APAP-induzierter Hepatotoxizität um eine Form der regulierten Nekrose handelt (Jaeschke et al., 2019; Jaeschke et al., 2021).

5.2.4 INFLAMMATION BEIM APAP-INDUZIERTEN ALV

Durch APAP-verursachte Nekrose zeigt deutliche Anzeichen einer Entzündungsreaktion wie das Anlocken von Makrophagen, beispielsweise Kupffer-Zellen, und die Aktivierung weiterer Entzündungszellen (Ito et al., 2003; Laskin et al., 2009). Insbesondere ist dabei die Leber das meist betroffene Organ. Bei toxischer Schädigung der Hepatozyten durch Nekrose werden Zytokine freigesetzt, welche zu einer Akkumulation von Leukozyten in den Venolen und in den Lebersinusoiden führen. Dies wiederum kann das bereits beschriebene Perfusionsdefizit weiter verstärken. Neben der Akkumulation der Leukozyten in den Sinusoiden wandern die Leukozyten in das umliegende Lebergewebe ein. Zusätzlich setzen die Leukozyten Proteasen frei, wodurch weitere Entzündungszellen das Gewebe infiltrieren (Ramaiah, 2007; Jaeschke et al., 2006), was wiederum zu einer verstärkten Entzündungsreaktion mit vermehrter Nekrose führt. Die Entzündungszellen werden hierbei insbesondere über das angeborene Immunsystem getriggert (Jaeschke et al., 2012a; 2012b). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Lyse der geschädigten Zelle mittels Induktion von oxidativem Stress in den Hepatozyten (Jaeschke et al., 2006).

Im APAP-Pathomechanismus werden bspw. durch eine Aktivierung von Kupffer-Zellen durch Abbauprodukte des APAP lokal Chemokine produziert, welche wiederum Leukozyten anlocken und sich hierdurch insbesondere der nekrotische Zellschaden ausdehnt (Liu und Kaplowitz, 2006).

Neben der nicht-sterilen Inflammation ist bei APAP-induziertem ALV auch die sterile Inflammation beschrieben (Kubes und Mehal, 2012; Ramachandran und Jaeschke, 2018). Die sterile Inflammation wird u.a. durch eine massive Freisetzung von sogenannten Damage-associated molecular patterns (DAMPs) detektiert (Ramachandran und

Jaeschke, 2018). DAMPs sind intrazelluläre Proteine, die bei Schädigung der Zellen passiv in den Extrazellularraum gelangen oder auch von Immunzellen aktiv sezerniert werden können. Sie können verschiedene Signale auslösen, wobei eine Entzündungsreaktion hervorgerufen oder beibehalten werden kann. Hierzu gehört auch das HMGB1. HMGB1 ist somit nicht nur als Marker von nekrotischem Gewebe beschrieben, sondern auch ein deutlicher Indikator für eine sterile Inflammation (Raucci et al., 2007). Diese DAMPs, wozu auch DNA-Fragmente gehören (Bianchi, 2009), sind insbesondere für die sterile Entzündungsreaktion verantwortlich und besitzen die Fähigkeit Monozyten und Neutrophile zu rekrutieren (Woolbright und Jaeschke, 2017). Neben der Entzündungsreaktion fördern DAMPs aber auch eine Regeneration von geschädigtem Gewebe.

Trotz dass es eine Entzündungsreaktion unter APAP gibt (Ramachandran und Jaeschke, 2017), sind beim APAP-induzierten ALV die Mikrozirkulation, die verschiedenen Zelltodmechanismen und die Inflammation gleichermaßen für therapeutische Ansätze von Bedeutung, da diese letztendlich alle nicht klar voneinander zu trennen sind bzw. einander bedingen und zu einem massiven Zellsterben der Hepatozyten mit zusehends abnehmender Leberfunktion führen (Jaeschke et al., 2012a; 2012b; Ito et al., 2003).

5.3 THERAPIE DES APAP-INDUZIERTEN ALV

Eine Therapie bei APAP-induziertem ALV gestaltet sich zunächst oft schwierig, da APAP-induziertes ALV lange symptomlos verlaufen kann oder die Symptome sehr unspezifisch sein können (Koch et al., 2017). Somit kann das APAP-induzierte ALV im Frühstadium maskiert werden (Koch et al., 2017). Im späteren Stadium zeigen sich meist die Leitsymptome Ikterus, hepatische Enzephalopathie und Koagulopathie (Rutter et al., 2018). Die Mortalitätsrate liegt für Patienten, die durch APAP ein ALV ausbilden bei bis zu 30% (Larson, 2007).

Die klinischen Therapieoptionen beim APAP-induzierten ALV sind vom Ausmaß der Leberschädigung und dem zeitlichen Zusammenhang zur Einnahme von APAP abhängig. Sobald die Schädigung eingetreten ist, bleiben nur wenige Optionen zur Behandlung.

Um das Ausmaß der Leberschädigung bei APAP-Intoxikation abschätzen zu können, werden im klinischen Alltag vorrangig die Transaminasen Alanin-Aminotransferase- (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) bestimmt. Diese können u.a. auf nekrotische Zellvorgänge hindeuten. Ebenfalls können die Transaminasen aber auch bei apoptotischen Zelluntergängen ansteigen (Ray und Jena, 2000; El-Hassan et al., 2003). Neuere Studien untersuchen nun weitere Parameter wie bspw. auch das HMGB1, die schneller eine Aussage darüber erlauben, ob der Patient überlebt, einen akuten

Leberschaden entwickelt oder letztendlich eine Transplantation benötigt (Antoine et al., 2009; Jaeschke, 2015).

Weiterhin wird ein großer Wert auf die Anamnese gelegt. Neben dem Arbeitsumfeld ist die Medikation und Komedikation zu erurieren, um mögliche Noxen als Ursache eines ALV identifizieren zu können. Durch letztere kann es zu einer Potenzierung der Gefahr eines ALV kommen. Besteht der Verdacht auf eine APAP-Intoxikation erfolgt eine Risikobewertung. Stellt sich der Patient innerhalb der ersten vier Stunden nach Einnahme vor, kann zunächst mittels einer Magenspülung und/oder Gabe von Aktivkohle therapiert werden (Underhill et al., 1990; Brok et al., 2006). Zudem ist aber ein umgehendes Messen der APAP-Konzentration mithilfe des Rumack-Matthew-Nomogramms nötig. Das Rumack-Matthew-Nomogramm setzt die APAP-Plasmakonzentration den Stunden nach Einnahme von APAP gegenüber. Hierbei liegt der Plasma *Peak* bei circa ein bis drei Stunden nach Aufnahme. Liegt dieser über einer bestimmten Höhe, ist das Outcome bei einer Therapie mit dem peroral- oder intravenös-applizierten Antidot von APAP, N-Acetylcystein (NAC), am besten (Salgia und Kosnik, 1999; Chun et al., 2009). NAC bindet den toxischen Metabolit NAPQI, erhöht die GSH-Speicher und fördert über die Sulfatierung die Ausscheidung von APAP (Smilkstein et al., 1988). Das Wirkoptimum von NAC liegt allerdings bereits in den ersten acht bis zehn Stunden nach Einnahme (Prescott et al., 1979; Prescott, 1981; Kozer und Koren, 2001). Jedoch ist eine Gabe bis zu 24 Stunden nach Einnahme noch sinnvoll (Smilkstein et al., 1988; Makin und Williams, 1997). Bei bereits bestehendem ALV kann auch nach 24 Stunden noch ein Therapieversuch erfolgen (Harrison et al., 1990), da sich in Studien trotzdem ein besserer Outcome als im unbehandelten Fall zeigte (Keays et al., 1991).

Sollten die o.g. Verfahren nicht anschlagen, bestehen weitere Therapiemöglichkeiten zum Beispiel durch die Verfahren der extrakorporalen Therapie (wie bspw. das Molecular Adsorbents Recirculating System (MARS) (Wittebole und Hantson, 2011)).

Diese Leberersatzverfahren, welche ähnlich einer Dialyse über eine semipermeable Membran stattfinden (Demetriou et al., 2004; Polson und Lee, 2005), dienen zur Überbrückung der Wartezeit auf ein geeignetes Spenderorgan (Brok et al., 2006). In diesem Stadium sind meist bereits die Kriterien zur Transplantation erfüllt. Die letzte Therapieoption stellt die Leber- bzw. Leberteiltransplantation dar. Hierbei ist jedoch weiterhin der Organmangel durch unzureichende Organspenden problematisch. Seit einigen Jahren gibt es in spezialisierten Zentren ebenfalls die Möglichkeit der Leber-Lebendspende, wobei ein Teil der Leber entnommen wird. Diese Leberteilspende birgt aber nicht zuletzt auch hohe Risiken für den Spender (Walter et al., 2008). Patienten, die an einem durch APAP-verursachten ALV leiden und die Transplantationskriterien erfüllen, haben ohne Transplantation sehr hohe Sterblichkeitsraten (Barshes et al., 2005).

Aufgrund der unzureichenden Therapieoptionen bei APAP-induziertem ALV ist die Entwicklung weiterer Strategien von hoher Bedeutung. Eine neue Option könnte dabei die Gabe von small interfering ribonucleic acid (siRNA) sein, welche spezifisch pathomechanistische Proteine des ALV herunter regulieren könnte.

Da es chemisch möglich ist, eine siRNA gegen nahezu jede zelluläre RNA zu entwickeln, können diese Moleküle jede Expression von Gen-verursachten Krankheiten herunterregulieren. Hieran wird das große therapeutische Potential dieser siRNAs sichtbar (Farra et al., 2006; Dapas et al., 2009; Grassi et al., 2010). SiRNAs bestehen aus RNA-Sequenzen mit einer Länge von 19 bis 25 Basenpaaren. Diese können einzel- oder doppelsträngig vorliegen. Zwei doppelsträngige RNA-Filamente, auch Sense- und Antisense-Stränge genannt, werden zur siRNA-Bildung benutzt. Bei der siRNA bindet der Antisense-Strang den Ziel-RNA-Strang mittels kompletter Komplementarität (Dapas et al., 2009).

Als Therapiekonzept wird siRNA bereits mit Erfolg experimentell bei der Hepatitis B eingesetzt. Hier konnte an Mäusen gezeigt werden, dass bei Einsatz der siRNA gegen HBV-Viren die Genexpression und Vervielfältigung dieser in den Hepatozyten der Mäuse unterdrückt werden konnte (Giladi et al., 2003; McCaffrey et al., 2003). Ebenfalls kann ein guter Therapieerfolg bei der altersbedingten Makuladegeneration erreicht werden. Die siRNA verhinderte tierexperimentell die Gefäßeinsprossung und das Voranschreiten der Makuladegeneration durch Unterdrückung der Expression des *Vascular Endothelial Growth Factor* (Ramachandran und Ignacimuthu, 2013).

Allerdings sind unter siRNA Gabe sogenannte *Off-target* Effekte beschrieben (Scaggiante et al., 2011). Hierbei bindet die siRNA nicht an die Zielsequenz, sondern an der Zielsequenz ähnliche Genabschnitte, was zu einer Beeinträchtigung der Genexpression dieser führen kann (Scaggiante et al., 2011). Dadurch können auch Auswirkungen auf den Stoffwechsel entstehen. Möglicherweise war durch diese *Off-Target* Effekte der Einsatz der siRNAs bislang nur begrenzt erfolgreich. Darüber hinaus hatten die bisher eingesetzten siRNAs *in vivo* nur systemische Wirkung. Solche siRNA-Applikationen werden allerdings durch ein geringes intrazelluläres Eindringen und einen schnellen Abbau durch extrazelluläre Nukleasen an der Stabilität im Blut und damit der Effektivität am Zielorgan deutlich limitiert (Huang et al., 2011). Dies vermindert den möglichen Effekt der Therapie *in vivo* (Jiang et al., 2012). Um eine höhere Stabilität und damit Verfügbarkeit zu erreichen, könnten gezielte organspezifische Zustellungssysteme der siRNAs von Vorteil sein, da so ein schneller Abbau vermieden wird.

Zudem wurde bei APAP-Intoxikationen ein Einsatz von siRNAs *in vitro* bereits gezeigt. *In vitro Silencing* von Bid in SECs der Leber durch die Verwendung von siRNAs zeigte einen

Schutz gegenüber der APAP-induzierten Toxizität (Badmann et al., 2012). Allerdings fehlen bisher *in vivo* siRNA Therapieansätze bei APAP-induziertem ALV.

5.4 ZIELE DER ARBEIT

Durch die Entwicklung einer leberspezifischen siRNA-DBTC-Formulierung durch *Silence Therapeutics GmbH* (Abshagen et al., 2015) bestand erstmals die Möglichkeit Bid *in vivo* als potentiell therapeutisches Target im APAP Pathomechanismus zu untersuchen. Dazu wurde dessen Genexpression mittels siRNAs „gesilencet“. Im Detail wurde der APAP-bedingte Leberschaden mit der hepatischen Mikrozirkulation, der DNA-Fragmentierung und der Inflammation *in vivo* mittels Intravitalfluoreszenzmikroskopie (IVM) in mit DBTC/siRNA^{Bid} behandelten Mäusen evaluiert. Komplettiert wurden die Ergebnisse durch laborchemische, histologische und molekularbiologische Analysen.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1 VERSUCHSTIERE

Für die Tierversuche wurden männliche C57BL/6J-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) verwendet. Die Tiere waren zwischen sechs bis acht Wochen alt und wogen zwischen 20 und 30 g. Die Tiere wurden in Gruppen von zwei bis fünf Tieren in Makrolon-Käfigen gehalten, wobei auf einen kontrollierten Tag-/Nachtzyklus geachtet wurde. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und Futter, welches der ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland entstammte. Die Nacht vor der APAP-Gabe wurden die Mäuse gefastet, um die hepatischen GSH-Konzentrationen zu reduzieren. Die Tierversuche wurden gemäß dem Tierschutzgesetz §8 Abs.1 durch die öffentliche Tierschutzbehörde und den Ethikrat genehmigt (LALLF 7221.3-1.1-016/14).

6.2 PRÄMEDIKATION

Insgesamt wurde der Versuch mit 60 Tieren durchgeführt. Hierbei wurde insgesamt 30 Mäusen in *phosphate-buffered saline* (PBS) gelöstes APAP von SIGMA (99% pur, 300 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal (KG i.p.)) verabreicht. Den anderen 30 Mäusen wurde PBS als Kontrolle in derselben Konzentration gegeben. Diese Konzentrationen mit 300mg/kg KG APAP oder PBS wurden analog zu bereits vorherigen Studien gewählt (Bajt et al., 2008; Jaeschke et al., 2011a). Vergleichbar mit anderen Arbeiten wurde ebenfalls der Zeitpunkt von + 6 h nach Induktion des ALV für die Untersuchungen definiert (Jaeschke et al., 2011a; Bajt et al., 2008) (Abbildung 4).

Auch bei der Vorbehandlung wurde sich an einer früheren Studie (Kuhla et al., 2015) orientiert. Die Tiere bekamen 48 h vor APAP- oder PBS-Gabe die siRNA in einem leberspezifischen siRNA-Zustellungssystem (DBTC) verabreicht. Dieses war entweder mit Bid-siRNA (DBTC/siRNA^{Bid}, n=20), mit unspezifischer Kontroll-siRNA (DBTC/siRNA^{Luci}, n=20) oder mit nur einem Transportmedium (DBTC/vehicle^{HEPES}, n=20), welches als Kontrolle bezüglich des *Silencing* von Bid fungierte, gekoppelt. Die Applikation der Prämedikation erfolgte verblindet.

6.2.1 OLIGONUKLEOTIDE

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA Moleküle sind stumpf-endende, doppelsträngige RNA Oligonukleotide (Tabelle 1). Stabilisiert wurden die Moleküle durch abwechselnde 2'-O-methyl- oder 2'-F-fluoro-Modifikationen an beiden Strängen, wie dies bereits in vorherigen Studien beschrieben wurde (Czauderna, 2003; Santel et al., 2006).

SIRNA TARGET	GUIDE STRAND	PASSENGER STRAND
BID	5' mUfUmUfGmAfGmAfUmCfA mGfCmCmAfUmUfGmG 3'	5' fCmCfGmAfAmUfGmGfCmUf GmAfUmCfUmCfAmAfA 3'
LUCI	5' mUfCmGfAmAfGmUfAmUfU mCfCmGfCmGfUmAfCmGfUm GfAmU 3'	5' fAmUfCmAfCmGfUmAfCmGf CmGfGmAfAmUfAmCfUmUfCm GfA 3'

Tabelle 1: Liste der siRNA-Moleküle: mA, mU, mC, mG: 2'-O-Methyl RNA und fA, fU, fC, fG: 2'-desoxy-2'-fluoro RNA

Hergestellt wurden die siRNAs von Biospring (Frankfurt a.M., Deutschland). Für die *in vivo* Gabe wurden die siRNAs mit DBTC versehen, welches von *Silence Therapeutics GmbH* entwickelt wurde und leberspezifisch wirkt (Abshagen et al., 2015).

6.3 TIERMODELL UND EXPERIMENTELLES PROTOKOLL

Es wurden je nach Art der Prämedikation und weiterer Behandlung sechs Gruppen mit je $n = 10$ Tieren unterteilt:

- DBTC/vehicle^{HEPES} / PBS
- DBTC/vehicle^{HEPES} / APAP
- DBTC/siRNA^{Luci} / PBS
- DBTC/siRNA^{Luci} / APAP
- DBTC/siRNA^{Bid} / PBS
- DBTC/siRNA^{Bid} / APAP

Alle Versuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt, wobei eine Verblindung des Experimentators erfolgte (Abbildung 4).

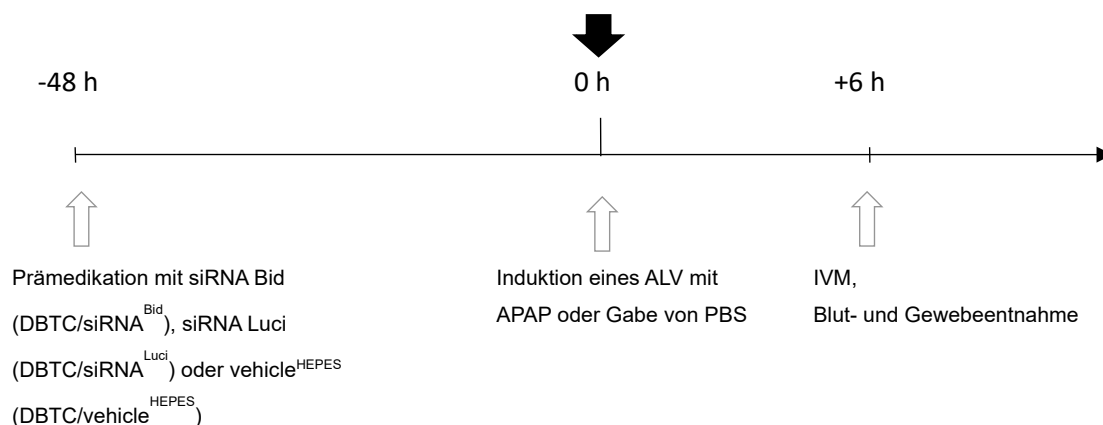


Abbildung 4: Versuchskinetik: 48 h vor Induktion eines akuten Leberversagens (ALV) mit Acetaminophen (APAP) oder der Gabe von phosphate-buffered saline (PBS) erfolgte die Prämedikation mit DBTC/siRNA^{Bid}, DBTC/siRNA^{Luci} oder DBTC/vehicle^{HEPES} (-48 h). Zum Zeitpunkt 0 h erfolgte die Induktion des ALV mit APAP oder die Gabe von PBS (0 h). Sechs Stunden danach schlossen sich die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) sowie die Blut- und Gewebeasservierung an (+6 h).

6.3.1 ANÄSTHESIE

Zur Narkose wurde eine selbst nach standardisiertem Anästhesieprotokoll zusammengestellte Suspension aus 0,6 ml Ketamin (10%ige Lösung) und 0,2 ml Xylazin (2%ige Lösung) in einer 1 ml Spritze verwendet.

Pro 10g KG der Maus wurden 0,01 ml Suspensionslösung mittels einer Insulinspritze intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Je nach intraindividuellem Wirkung musste nochmal bis zur ausreichenden Sedierung nachdosiert werden. Nach erfolgreicher Narkose wurden die Tiere am Hals sowie am Bauch manuell rasiert. Die Mäuse wurden auf einer Heizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) gelagert um eine konstante Körpertemperatur von circa 36 – 37 °C aufrechtzuerhalten (Abbildung 5).



Abbildung 5: Instrumentenansicht der benötigten Utensilien. Links: Jugulariskatheter, Präparationsbesteck, Elektrokaute, Einwegasierer und Knetlöffel zur Leberlagerung; Rechts: Wärmeplatte zur Körpertemperatur gerechten Lagerung

6.3.2 CHIRURGISCHE PRÄPARATION

Zunächst wurde die Präparation der Vena jugularis externa durchgeführt, wobei ein 1 cm langer paratrachealer Schnitt vorgenommen wurde. Zur besseren Sicht wurde unter einem Stereomikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) operiert. Nach der Längsinzision wurde das paratracheale Fett mobilisiert und die Vena jugularis externa freigelegt (Abbildung 6). Hierbei wurde zunächst das proximale und anschließend das distale Ende ligiert. Daraufhin wurde mittels mikrochirurgischer Schere ein circa 1 mm langer Schnitt in Querrichtung durchgeführt. Hierin wurde der Polyethylenkatheter gelegt (PE 50, 0,28 mm Innendurchmesser, 0,61 mm Außendurchmesser, Smiths Medical International Ltd., Kent, UK) und um durchschnittlich 0,3 cm nach kaudal vorgeschoben. Dieser wurde mittels der oben erwähnten zwei Ligaturen fixiert. Durch den Katheter folgte kurz vor der IVM die intravenöse Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe (siehe Abschnitt 6.4).

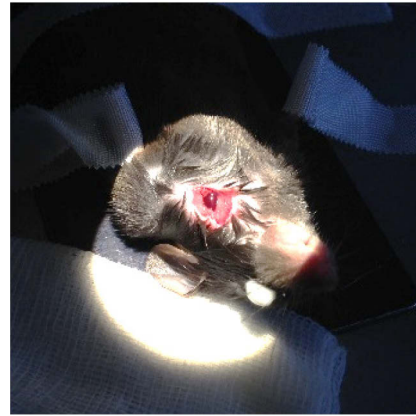


Abbildung 6: Vorbereitungen zur Präparation der Vena jugularis externa. Links: Desinfektion der späteren Präparationsstelle; Rechts: Präparation bis auf die Vena jugularis externa.

Anschließend folgte die mediane Laparotomie, wobei diese noch durch je einen Flankenschnitt kurz kaudal der Rippen erweitert wurde. Hierdurch konnte die Leber nun gut dargestellt werden. Eventuelle kleinere Blutungen wurden mittels Elektrokauterisierung gestoppt. Die zwei oberen Hautlappen wurden auf zwei Haken kranialwärts befestigt, so dass sie später bei der IVM das Sichtfeld nicht behinderten. Die zwei kaudalen Lappen wurden mit einem mit Natriumchlorid (NaCl) befeuchteten Tupfer abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Außerdem wurde auf eine gute Befeuchtung der Bauchorgane mittels NaCl geachtet. Der linke Leberlappen wurde nun vorsichtig von seinen Bändern zum Zwerchfell, Magen sowie der Bauchwand (Retroperitoneum) befreit, wobei stets eine ausreichende Befeuchtung der Leber sichergestellt wurde.

Zur Vorbereitung auf die IVM wurde dieser Leberlappen mittels zweier befeuchteter Wattestäbchen im Uhrzeigersinn um 180° gedreht und auf einen selbst gefertigten Knetlöffel gelegt. Die anatomische Unterseite dieses Lappens wurde nun nochmal befeuchtet und anschließend mit einem Deckglas (Durchmesser 12 mm) abgedeckt. Anschließend wurden die Fluoreszenzfarbstoffe über den Jugulariskatheter verabreicht.

6.4 INTRAVITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE (IVM)

Eine *in vivo* Beobachtung der Durchblutungsverhältnisse ermöglicht die IVM. Die IVM arbeitet mit der Technik der Epi-Illumination, welche heute die Methode der Wahl ist, um das hepatische Gefäßsystem wie auch die Leukozyteninteraktionen und morphologische Veränderungen der Hepatozyten darzustellen (Menger et al., 1991; Vollmar und Menger, 1998).

6.4.1 GRUNDLAGEN DER IVM

Der Begriff Fluoreszenz beschreibt ein physikalisches Phänomen, bei dem es zur spontanen Emission von Licht kommt. Er leitet sich vom Namen des Minerals Fluorit ab, welches diese Eigenschaft besitzt. Fluorit absorbiert Licht im UV-Bereich und emittiert Licht

im sichtbaren Wellenlängenbereich. Fällt Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein Molekül, kommt es zur Absorption von Photonen innerhalb des Moleküls (bzw. Atoms), welches dadurch kurzzeitig ein höheres Energieniveau erlangt (Exzitation). Dieses Energieniveau kann aber nicht lange gehalten werden, sodass es zu einer Energieabgabe (meist in Form von Wärme) und Emission von Photonen höherer Wellenlänge kommt (Gressner und Arndt, 2019). Um die vom menschlichen Auge wahrnehmbare Emission von Photonen zu erreichen sind daher die exzitative wie auch die emittierte Wellenlänge bei den Fluoreszenzeigenschaften zu beachten.

Das für diese Arbeit genutzte Fluoreszenzmikroskop war ein Auflichtmikroskop mit einer 100 W Quecksilberlampe als Lichtquelle (Abbildung 7). Ein der Lichtquelle nachgeschalteter Filterblock (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland) wurde zur Anregung der unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffe benötigt (Anregungsfilter). Dies ermöglichte die Selektion von UV Licht (Exzitation: Wellenlänge 330-380 nm, Emission: Wellenlänge >414 nm) sowie von Licht mit grüner (Exzitation: Wellenlänge 530-560 nm, Emission: Wellenlänge >580 nm) und mit blauer Wellenlänge (Exzitation: Wellenlänge 450-490 nm, Emission: Wellenlänge >515 nm).

Um Streustrahlung des Lichtes zu verhindern sind Strahlenquelle und Kamera räumlich getrennt. Ein in den Zwischenraum eingebrachter Filter trennt die reflektierte Strahlung, sodass nur die emittierte Strahlung zur Darstellung kommt. Durch verschiedene Objektive ist eine Vergrößerung von 212- bis 848-fach möglich.

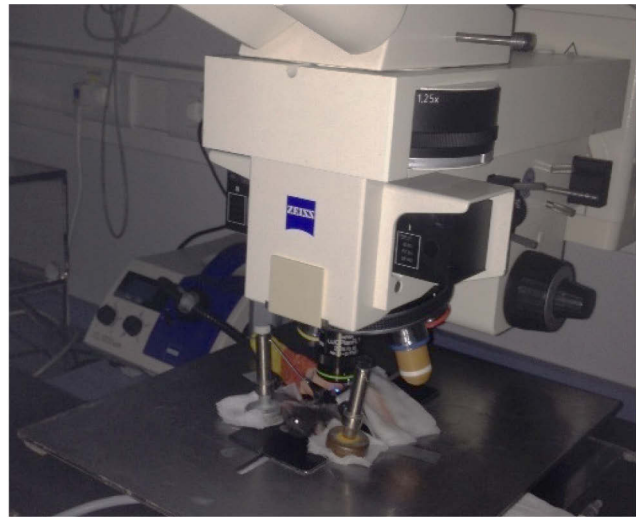


Abbildung 7: Darstellung des Mikroskops sowie des Versuchstieres auf der Wärmeplatte; Links: Freilage der Leber zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM); Rechts: Hakenhalterung zur freien Sicht auf die auf dem Knetöfel gelagerte Leber.

Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer *charge-coupled device* (CCD) Videokamera (FK 6990AIQ, Pieper, Berlin, Deutschland) digital konvertiert und für eine spätere Auswertung auf einen DVD-Rekorder (Fuji Magnetics GmbH, Kleve, Deutschland) übertragen und dort gespeichert.

Durch einen Videozeitgenerator besteht die Möglichkeit die Aufnahmen nach Datum und Uhrzeit sowie durch eine individuelle Beschriftung für die spätere Auswertung zu kennzeichnen. Diese erfolgte an einem PC Arbeitsplatz unter Verwendung des Programms *CapImage* (CapImage, Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Durch die intravitale Fluoreszenz ist es möglich dynamische Prozesse wie etwa die sinusoidale Perfusion, die sinusoidale Leukozytenstase, das venuläre Leukozytenrolling, die Leukozyten-Endothelzellinteraktion sowie morphologische Veränderungen des Leberparenchyms, wie bspw. die DNA-Fragmentierung der Zellen, zu beurteilen (Eipel et al., 2007; Le Minh et al., 2007).

6.4.2 HEPATISCHE MIKROZIRKULATION

Die Mikrozirkulation der Leberkapillaren wurde mittels des Farbstoffes Natriumfluoreszin (Merck, Darmstadt, Deutschland) dargestellt. Dazu wurde dieser in einer Konzentration von 2 $\mu\text{mol/kg}$ KG der Maus intravenös injiziert und es stellte sich eine Kontrastierung zum umliegenden Gewebe dar. Durch Diffusion aus den Sinusoiden erscheinen diese in der Mikroskopie dunkler als das umliegende Gewebe. Bei Licht blauer Wellenlänge mit 212-facher Vergrößerung erfolgte die Aufnahme von zehn, nach dem mäanderförmigen Muster ausgewählten Leberazini pro Maus für die Dauer von jeweils zehn Sekunden (Auswertung siehe Abschnitt 6.4.6).

6.4.3 VENULÄRES LEUKOZYTENROLLING UND LEUKOZYTENADHÄRENZ

Unter Exzitation von blauem Licht wurden Konzentrationen von 2 $\mu\text{mol/kg}$ KG Natriumfluoreszin (Merck, Darmstadt, Deutschland) und ebenfalls von 1 $\mu\text{mol/kg}$ KG Rhodamin 6G verabreicht. Die Venolen wurden bei 424-facher Vergrößerung aufgesucht. Anschließend wurde auf grüne Wellenlänge gewechselt und die durch Rhodamin angefärbten Leukozyten frei fließend, rollend bzw. stagnierend über 20 Sekunden aufgezeichnet (Auswertung siehe 6.4.6).

6.4.4 SINUSOIDALE LEUKOZYTENSTASE

Die Darstellung erfolgte mittels Kontrastierung durch 2 $\mu\text{mol/kg}$ KG Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt, Deutschland). Unter grünem Licht wurden die adhärenenten Leukozyten in den Sinusoiden mit 424-facher Vergrößerung aufgesucht. Es erfolgte wiederum eine Aufzeichnung von zehn Gesichtsfeldern je Tier nach dem mäanderförmigen Muster von jeweils 20 Sekunden (Auswertung siehe Abschnitt 6.4.6).

6.4.5 DNA-FRAGMENTIERUNG

Mit Bisbenzimid wird die Chromatinstruktur der Hepatozytenzellkerne angefärbt, sodass diese zur Darstellung kommen. Im Zuge der Apoptose kommt es zur Fragmentierung und Kondensation des Chromatins, welches dann bei 848-facher Vergrößerung unter UV Licht

im Vergleich zu regulären Zellkernen unterscheidbar wird. Neuere Studien beschreiben die DNA-Fragmentierung außer bei der Apoptose auch bei bestimmten Formen der Nekrose, daher wird in dieser Arbeit allgemein von DNA-Fragmentierung gesprochen (Jaeschke et al., 2012a) (Auswertung siehe Abschnitt 6.4.6).

6.4.6 AUSWERTUNG DER IVM-PARAMETER

Die Auswertung wurde an einem Computer Arbeitsplatz mithilfe des Programms CapImage durchgeführt (Abbildung 8). Hierzu wurde für die hepatische Mikrozirkulation eine 200 µm lange Rasterlinie im 90° Winkel über die zur Betrachtung bestimmten Sinusoide der Leberläppchen gelegt. Daraufhin erfolgte die Zählung perfundierter Sinusoide im Vergleich zu der Gesamtzahl betrachteter Sinusoide (durchschnittlich 8-10 Stück). Beide Zahlen wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt und sind in Prozent perfundierter Sinusoide angegeben.

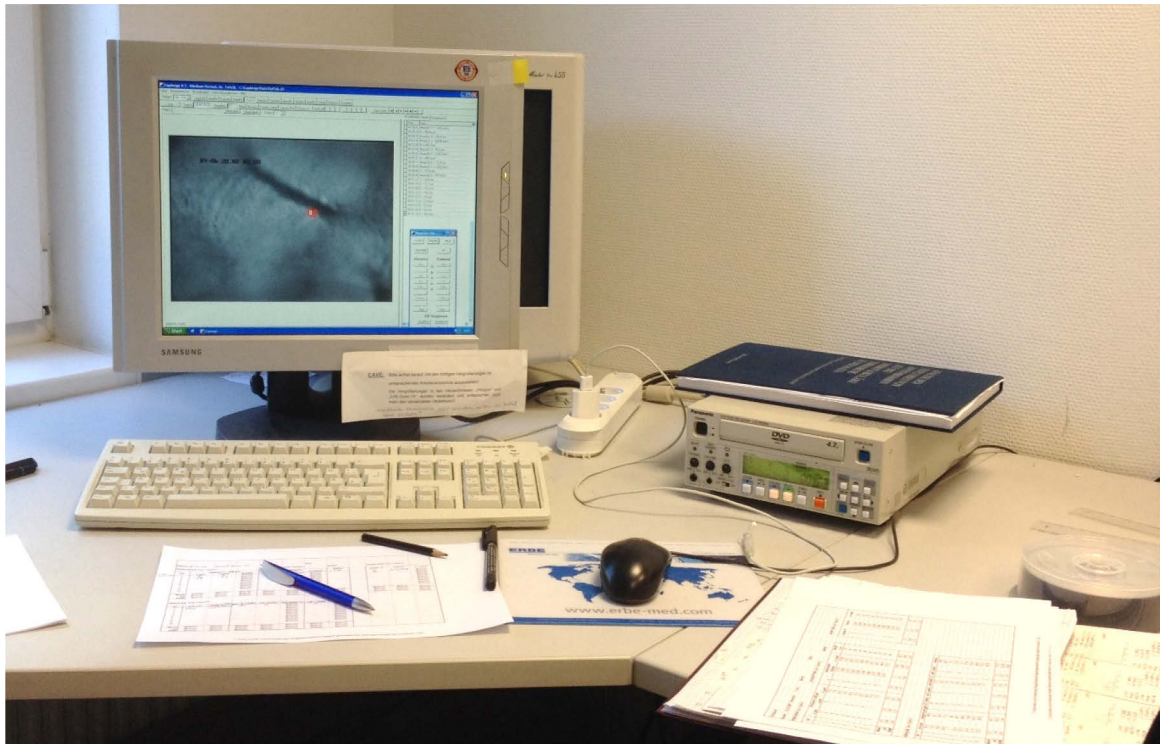


Abbildung 8: Darstellung des PC Arbeitsplatzes zur Auswertung der intravitalmikroskopischen (IVM)-Parameter. Auf dem PC ist eine Lebervene sichtbar.

Zur Auswertung der passierenden Leukozyten pro Venole wurde der betrachtete Abschnitt der Venole zunächst nach Länge und Durchmesser markiert und vermessen. Unter der Annahme einer zylindrischen Form konnte so die Endotheloberfläche berechnet werden. Es wurden die durchfließenden Leukozyten pro aufgenommener Zeit gezählt ebenso wie die rollenden Leukozyten pro Zeitfenster. Die Rollenden wurden dann ins Verhältnis zu allen im gleichen Zeitabschnitt durchgeflossenen Leukozyten gesetzt und sind in % angegeben. Die permanent adhärenenten Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen

wurden ebenfalls gezählt und ins Verhältnis mit der errechneten Endothelzelloberfläche gesetzt und sind in n/mm^2 angegeben. Zur Auswertung der sinusoidalen Leukozytenstase wurden die permanent über 20 Sekunden stagnierenden Leukozyten in den Sinusoiden ins Verhältnis mit der Fläche des Gesichtsfeldes gesetzt und sind in n/mm^2 angegeben.

Bei der DNA-Fragmentierung wurde die Anzahl der Kerne mit fragmentiertem oder kondensiertem Zellchromatin im Verhältnis zur Gesamtfläche des beobachteten Arels beurteilt und in n/mm^2 angegeben.

6.5 BLUT- UND GEWEBEENTNAHME

Nach Beendigung der Aufnahmen am IVM wurden die Tiere durch Entnahme von Blut aus der *Vena cava inferior* entblutet und damit euthanasiert (Abbildung 9). Durchschnittlich wurden pro Maus 1,5 ml Blut entnommen. Anschließend wurde die gesamte Leber entfernt. Das Lebergewebe wurde für histologische und molekularbiologische Analysen asserviert. Der linke Leberlappen wurde für die Histologie, die restlichen Leberanteile für die molekularbiologischen Analysen verwendet, welche durch Schockfrostung in flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert wurden. Der für die Histologie bestimmte Anteil wurde in 4%iger Formalinlösung für zwei bis drei Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.



Abbildung 9: Die zur Blut- und Gewebeentnahme benötigten Utensilien sowie die zur Entblutung genutzten modifizierten Insulinspritzen.

6.5.1 BLUTBILD UND PLASMAASSERVIERUNG

Die entnommenen Blutproben wurden zunächst im EDTA Röhrchen asserviert. Mit Hilfe des KX-21 Automaten (Firma Sysmex, Norderstedt, Deutschland) wurde ein Blutbild erstellt. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 4000 rpm (GS15 Zentrifuge, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und das so gewonnene Plasma bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

6.5.2 BESTIMMUNG VON AST, ALT, HMGB1 UND CYPA

Zur Ermittlung der hepatotoxischen Wirkung von APAP wurden die ALT- sowie die AST-Konzentrationen im Plasma spektrofotometrisch mit Hilfe eines Cobas c111 Automaten (Firma Roche, Basel, Schweiz) bestimmt und sind in U/l angegeben.

Als weitere Indikatoren für den nekrotischen Zelltod wurden CyPA und HMGB1 im Plasma bestimmt. Das zur Immunophilin-Familie gehörende, zytosolisch vorkommende CyPA wird frühzeitig bei Nekrose bzw. Unterformen der Nekrose freigesetzt, sobald die Plasmamembran in ihrer Funktion eingeschränkt ist (Christofferson und Yuan, 2010). HMGB1 wurde neben der Nekrose ebenfalls als Marker für die sterile Inflammation genutzt. Es wird u.a. durch nekrotische Zellen freigesetzt.

Die Konzentrationsbestimmungen der o.g. Parameter erfolgten mittels Elisa Kits (HMGB1: IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland und CyPA: LSBio, LifeSpab BioScience, Inc., Seattle, WA) nach Herstellerangaben und sind in ng/ml angegeben.

6.5.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEN

6.5.3.1 WESTERN BLOT ANALYSE

Für die Proteinexpressionsanalysen von Caspase 3, Bid, Bax und Bcl2 wurden Western Blots durchgeführt, als Kontrolle dienten die Expressionsanalysen von β -actin bzw. α -actinin. Hierzu wurden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen, um sie mittels verschiedener Antikörper zu detektieren. Der Nachweis der einzelnen Proteine wurde nach Transferierung auf eine Membran durch das Aufbringen spezifischer Primär- (Tabelle 2) und Sekundärantikörper durchgeführt. Durch die Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der eingesetzten Proben des Proteingemischs nach ihrer Größe mit Hilfe der Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Dafür wurde schockgefrorenes Gewebe in Lysis-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% Na₃N und 0,2 mM PMSF (ein Protease Inhibitor Cocktail) homogenisiert. Danach erfolgte die 30-minütige Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C und 10.000 x g.

ANTIKÖRPER	BEZEICHNUNG
BID	monoklonaler Maus anti-Bid Antikörper (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA)
BAX	monoklonaler Maus anti-Bax Antikörper (1:250, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
BCL2	monoklonaler Maus anti-bcl2 Antikörper (1:500, BD Pharmingen)
α-ACTININ	Kaninchen alpha-actinin Antikörper (1:500, Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland)
β-ACTIN	monoklonaler Maus anti- β -actin Antikörper (1:20000; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
CLEAVED CASPASE 3	polyklonaler Kaninchen anti-cleaved-caspase-3 Antikörper (1:1000, Asp 175; Stressgen Biotech, San Diego, CA, USA)

Tabelle 2: verwendete Antikörper bei den Western Blot Analysen

Der Proteingehalt wurde mit der Bicinchoninic Säure Methode (Pierce Biotechnology) mit 2,5% BSA (Bovines Serum Albumin) (Pierce Biotechnology) als Standard angegeben. Auf 14% SDS Gel wurden 40 μ g Protein vom Lebergewebe separiert und anschließend auf eine Polyvinylidendifluoride Membran (Immobilon-P; Millipore) transferiert. Nach einer Blockierung mit 2,5% BSA (Pierce Biotechnology) wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit den in Tabelle 2 aufgeführten Antikörpern jeweils inkubiert (Bid, Bax, Bcl2 und cleaved caspase 3).

Der Kaninchen alpha-actinin Antikörper (1:500, Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland) und der Maus anti- β -actin Antikörper (1:20000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden dabei als Beladungskontrollen verwendet. Anschließend wurden sekundäre Peroxidase-verknüpfte anti-Maus Antikörper (Bax und Bcl2, 1:20000; β -actin, 1:60000), anti-Kaninchen Antikörper (Bid, 1:40.000; actinin, 1:500) oder Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Cleaved Caspase 3, 1:2000) eingesetzt. Die Digitalisierung erfolgte mit dem ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad Laboratories). Die Ergebnisse wurden densitometrisch ausgewertet (Quantity One; Bio-Rad Laboratories) und gegenüber β -actin ins Verhältnis gesetzt. Bid- und α -actinin Blots wurden mithilfe des Stella Camera Systems und AIDA Image Analyser Software 4.25 (Mannheim, Germany) analysiert.

6.5.3.2 REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) ANALYSE

Für die hepatische mRNA-Expression von *bid* und *cyp2e1* wurden circa 20 mg Gewebe in einem Mixer Mill MM301 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) mit einer Wolfram Hartmetall Perle (tungsten carbide beads (Qiagen)) homogenisiert. Die gesamte RNA wurde mit Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitek, Berlin, Deutschland) isoliert.

TARGET	AMPLICON SETS	
BID	mBID:462U20	ACAGCTAGCCGCACAGTTCA
	mBID:552L22	GGCTGTCTTCACCTCATCAAGG
	mBID:493U28FL	CTGTCGGAGGAAGACAAAAGGAAGTCC
CYP2E1	mCYP2E1:563U22	ATATGCCCTACATGGACGCTGT
	mCYP2E1:652L19	TGTCTCGGGTTGCTTCGTG
	mCYP2E1:603U28L	ATTCATCAACCTCGTCCCTTCCAACCTG
APOB	mApoB:2889U22	AAAGAGGCCAGTCAAGCTGTTT
	mApoB:2966L22	GGTGGGATCACTTCTGTTTTGG
	mApoB:2916U29FL	CAGCAACACACTGCATCTGGTCTCTACCA

Tabelle 3: Liste der Amplicon Sets

Abhängig vom Gewebe wurden 25-100 µg totale RNA für die quantitative *TaqMan Real Time* (RT)-PCR mit den *Amplicon Sets* (von BioTez GmbH, Berlin, Deutschland) benutzt, als Housekeeping Gen wurde ApoB verwendet (siehe Tabelle 3). Die TaqMan RT-PCR Reaktionen wurden mit einem ABI PRISM 7700 Sequenz Detektor durchgeführt (Software: Sequence Detection System v1.6.3 (ABI)) oder mit dem StepOnePlus™ RT-PCR System (ABI), wobei hier das Standard Protokoll für RT-PCR benutzt wurde, wie bereits beschrieben (Santel et al., 2006). Proben wurden mit einer Konzentration von 300 nM oder 100 nM benutzt. Die Daten von TaqMan wurden mit der vergleichbaren CT Methode berechnet.

6.5.4 BESTIMMUNG DER HEPATISCHEN GSH-KONZENTRATION

Für die Messung der hepatischen GSH-Konzentration zur Detektion potentieller *Off-target* Effekte wurde das Lebergewebe mit 50 mM Phosphat Puffer, welcher 1 mM EDTA (pH 6-7) beinhaltet, homogenisiert. Danach wurde es mit Metaphosphorsäure und Triethanolamin entproteinisiert. Die GSH-Konzentration wurde mittels eines Glutathion Essay Kits laut Anweisungen des Herstellers (Cayman Chemical Company, MI, USA) bestimmt und ist in µmol/g Lebergewebe angegeben.

6.5.5 HISTOLOGIE: HÄMATOXYLIN & EOSIN (H&E)-FÄRBUNG

Vom asservierten und in Paraffin eingebetteten Lebergewebe wurden 4 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt. Anschließend wurden die Präparate mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Hämatoxylin färbt dabei vor allem basische Strukturen wie Zellkerne und DNA blau, während Eosin azidophile Strukturen wie Proteine im Zellplasma rot anfärbt. Für die Nekrose charakteristische Korrelate sind die Zellschwellung und Vakuolisierung sowie die Membranruptur und Karyolyse der Hepatozyten.

In Abbildung 10 ist die physiologische Struktur der Leberazini (links) im Vergleich zum nekrotischen Areal (rechts) dargestellt. Durchschnittlich wurden pro Versuchstier zwischen 20-40 Gesichtsfelder mäanderförmig ausgewählt.

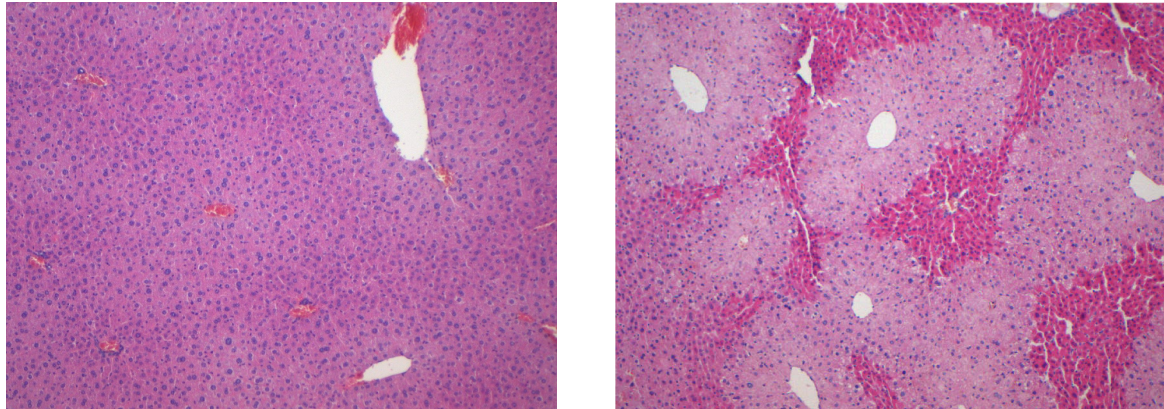


Abbildung 10: Repräsentative Abbildungen des Leberparenchyms (Vergrößerung 40x). Links: physiologische Struktur der Hepatozyten, angeordnet in Läppchen um eine Zentralvene. Rechts: Leberparenchym nach APAP-Gabe mit nekrotischen Arealen, welche sich besonders ausgeprägt um die Zentralvenen darstellen.

In diesen wurden mithilfe eines 40er Objektivs (numerische Apparatur 0,65) die nekrotischen Areale ausfindig gemacht und prozentual ins Verhältnis zur gesamten betrachteten Fläche gesetzt. Aus allen betrachteten Arealen pro Versuchstier wurde letztendlich ein Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW $\pm$ SEM) gebildet und in Prozent angegeben. Nach Abschluss aller Analysen wurde der Experimentator entblindet und es erfolgte die Zuordnung der entsprechenden Asservate zu den jeweiligen oben genannten Gruppen.

6.6 STATISTIK

Die einzelnen Daten aus den intravitalmikroskopischen, laborchemischen, molekularbiologischen und histologischen Analysen wurden mit dem Programm Microsoft Excel bearbeitet. Hierbei wurde der Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW $\pm$ SEM) berechnet. Die Mittelwerte berechneten sich aus den Einzelwerten eines Parameters pro Versuchstier und Gruppe. Die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA) einschließlich aller Gruppen wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu detektieren. Anschließend erfolgte der *Post-Hoc-Pairwise-Comparison-Test* für multiple Vergleiche, welcher die Bonferroni-Korrektur beinhaltet. Dieser Test wurde durchgeführt, um herauszufinden, welche Gruppen sich untereinander unterscheiden. Für nicht normalverteilte Werte erfolgte der einfache Paarvergleich (Mann-Whitney-U-Test). Für die statistische Auswertung wurde die Software SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet. Ein Konfidenzintervall von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Dargestellt wurden die Werte mit dem Programm SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

7. ERGEBNISSE

7.1 BID-SILENCING BEIM APAP-INDUZIERTEN ALV

Zunächst wurde mittels Western Blot untersucht, inwieweit ein Bid-Silencing auf Proteinebene in der Leber erfolgreich war (Abbildung 11). Dabei zeigte sich eine signifikant reduzierte Bid-Proteinexpression unter Gabe von DBTC/siRNA^{Bid} gegenüber der Vorbehandlung mit DBTC/vehicle^{HEPES} (n=8, p=0,013; 70%ige Reduktion, Abbildung 11 B) in APAP-exponierten Mäusen. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 11 A dargestellt.

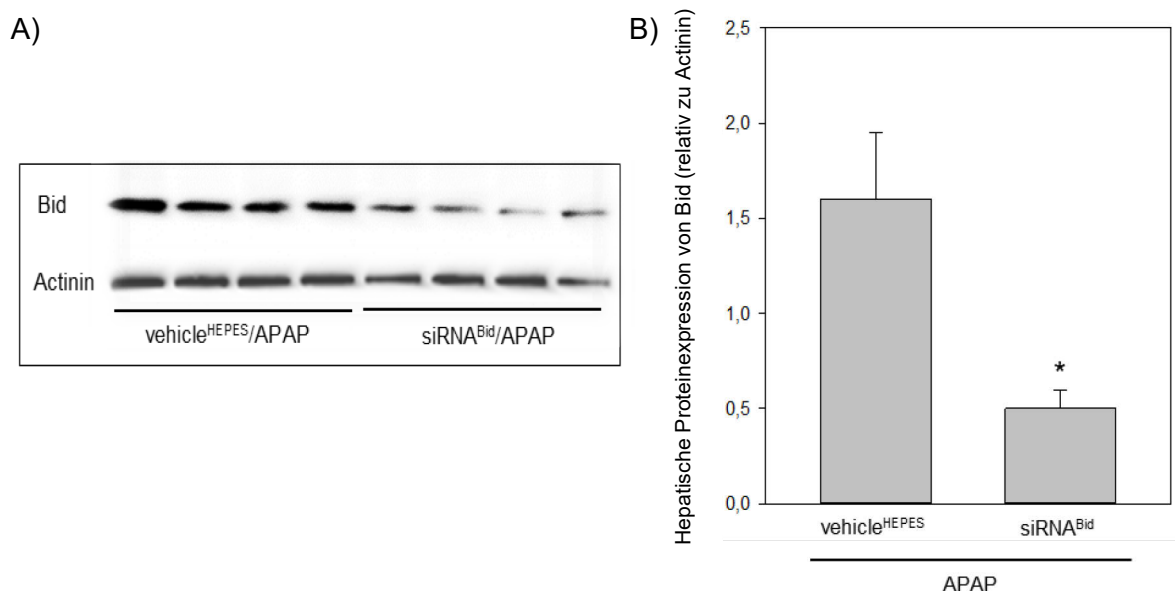


Abbildung 11: Repräsentativer Western Blot (A) und quantitative Auswertung des BH3-interacting domain death agonist (Bid) (B). Dargestellt ist die Expression von Bid bei Acetaminophen (APAP)-Behandlung unter Gabe eines Transportmediums als Kontrolle (DBTC/vehicle^{HEPES}/APAP) und unter Gabe von DBTC/siRNA^{Bid}/APAP (B). Alle Tiere erhielten -48 h vor der APAP Injektion (n=20, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem (DBTC/siRNA^{Bid} (n=10) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=10)). Die Mäuse wurden 6 h später untersucht (+6 h). Die Signale wurden mit dem des Actinin korrigiert. Anschließend erfolgte die quantitative Auswertung des Western Blots (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; Mann-Whitney-U-Test: * p < 0,05 vs. vehicle^{HEPES}.

Um diese Ergebnisse zu fundieren, erfolgte ebenfalls die Untersuchung des *Silencing* der *bid*-Expression auf mRNA-Ebene. Hierzu wurde eine RT-PCR durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 12 dargestellt sind. Durch die Vorbehandlung mit DBTC/siRNA^{Bid} konnte insbesondere unter der Gabe von APAP aber auch in der Kontrollgruppe mit PBS die *bid*-mRNA-Expression signifikant um bis zu 79% gesenkt werden (Abbildung 12). Die *bid*-mRNA-Expression wurde demnach stark herabreguliert, allerdings besteht noch eine geringe mRNA-Expression (Abbildung 12), welche die weiterhin vorhandene geringe Bid-Proteinexpression erklärt (Abbildung 11).

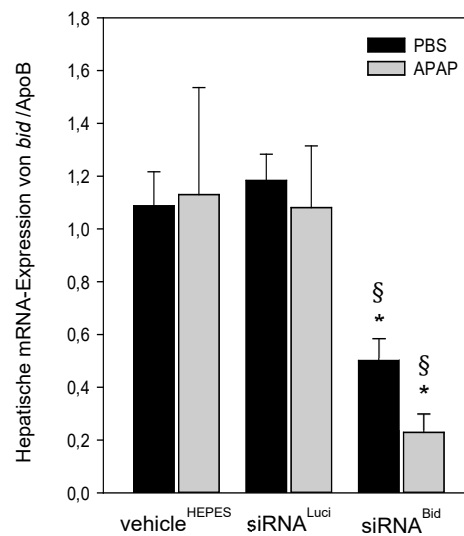


Abbildung 12: Quantitative Analyse der hepatischen mRNA-Expression des BH3-interacting domain death agonist (*bid*). C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse wurden gegenüber ApoB korrigiert und sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, *post-hoc pairwise comparison* Test, Bonferroni Korrektur: * $p < 0,05$ vs. DBTC/siRNA^{Luci}; § $p < 0,05$ vs. DBTC/vehicle^{HEPES}.

7.2 INTRAVITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE

7.2.1 HEPATISCHE MIKROZIRKULATION

Unter PBS-Exposition zeigten sich sehr geringe Mikrozirkulationsstörungen von maximal 3% der Lebersinusoide bei allen Vorbehandlungen. Nach Induktion des ALV durch die Gabe von APAP fand sich in den Gruppen mit *non-targeting control lipoplex* (DBTC/siRNA^{Luci}) oder dem Transportmedium (DBTC/vehicle^{HEPES}) ein signifikantes Perfusionsdefizit um bis zu 33% gegenüber den PBS-behandelten Tieren ($p < 0,05$ vs. PBS, Abbildung 13 A). Unter DBTC/siRNA^{Bid}-Vorbehandlung zeigte sich eine verbesserte Perfusion, welche lediglich nur um 20% reduziert war (ca. 20 % Perfusionsdefizit, Abbildung 13 A), jedoch nicht Normalniveau erreichte. In Abbildung 13 B) sind repräsentative IVM-Aufnahmen der Versuchstiere unter Gabe des Transportmediums (DBTC/vehicle^{HEPES}) und unter Gabe von DBTC/siRNA^{Bid} gezeigt.

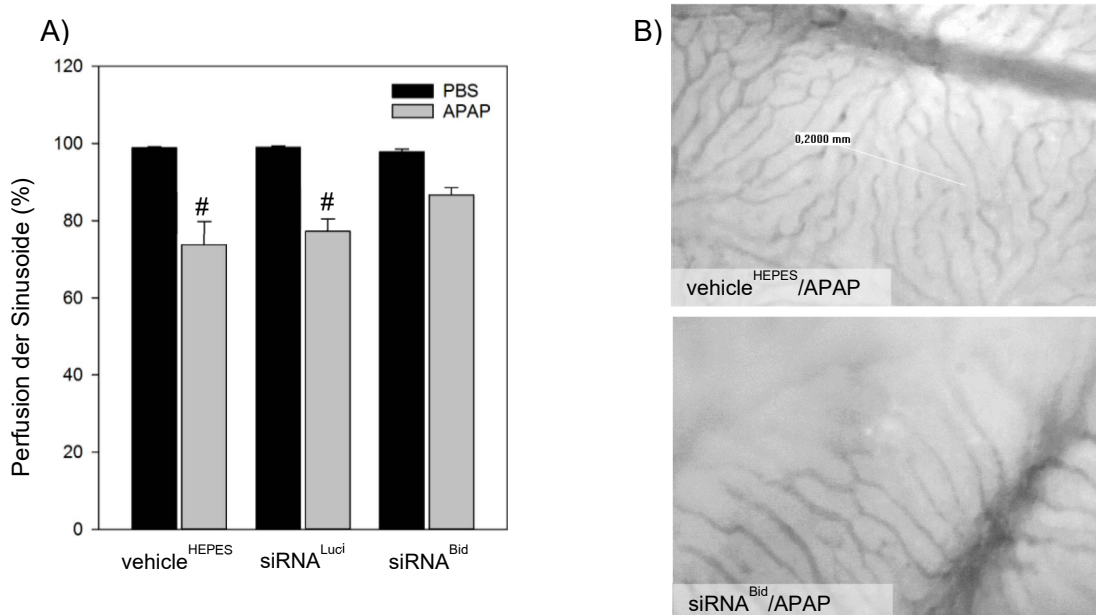


Abbildung 13: Quantitative Analyse der sinusoidalen Perfusion (A) mit repräsentativen intravitalmikroskopischen (IVM)-Aufnahmen (B, Vergrößerung 200x). C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur: # p < 0,05 vs. PBS.

7.2.2 LEUKOZYTENINTERAKTIONEN

7.2.2.1 VENULÄRES LEUKOZYTENROLLING UND LEUKOZYTENADHÄRENZ

In der IVM von APAP-exponierten Lebern fanden sich charakteristische Züge von akuter Entzündung (Abbildung 14). Dies zeigte sich in einem signifikanten Anstieg von sowohl rollenden als auch adhärenenten Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen (Abbildung 14 A und B, p < 0,05 vs. PBS) nach Induktion eines ALV mit APAP. Allerdings waren die APAP-induzierte Leukozytenanzahl in den Venolen, beurteilt durch das Fließverhalten der Leukozyten, ebenso wie die postsinusoidale Leukozytenadhärenz (Abbildung 14 B) in den verschiedenen mit DBTC/siRNA behandelten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 14 A). So gab es keine Reduktion der Leukozyteninteraktionen unter DBTC/siRNA^{Bid}-Vorbehandlung in APAP-exponierten Tieren (Abbildung 14 A und B). PBS-exponierte Lebern zeigten niedrige Leukozytenwerte, sowohl venulär adhärenenter (Abbildung 14 B) wie auch rollender/fließender Leukozyten (Abbildung 14 A) bei allen Vorbehandlungen. In Abbildung 14 C sind repräsentative IVM-Aufnahmen der unterschiedlichen Versuchstiergruppen gezeigt.

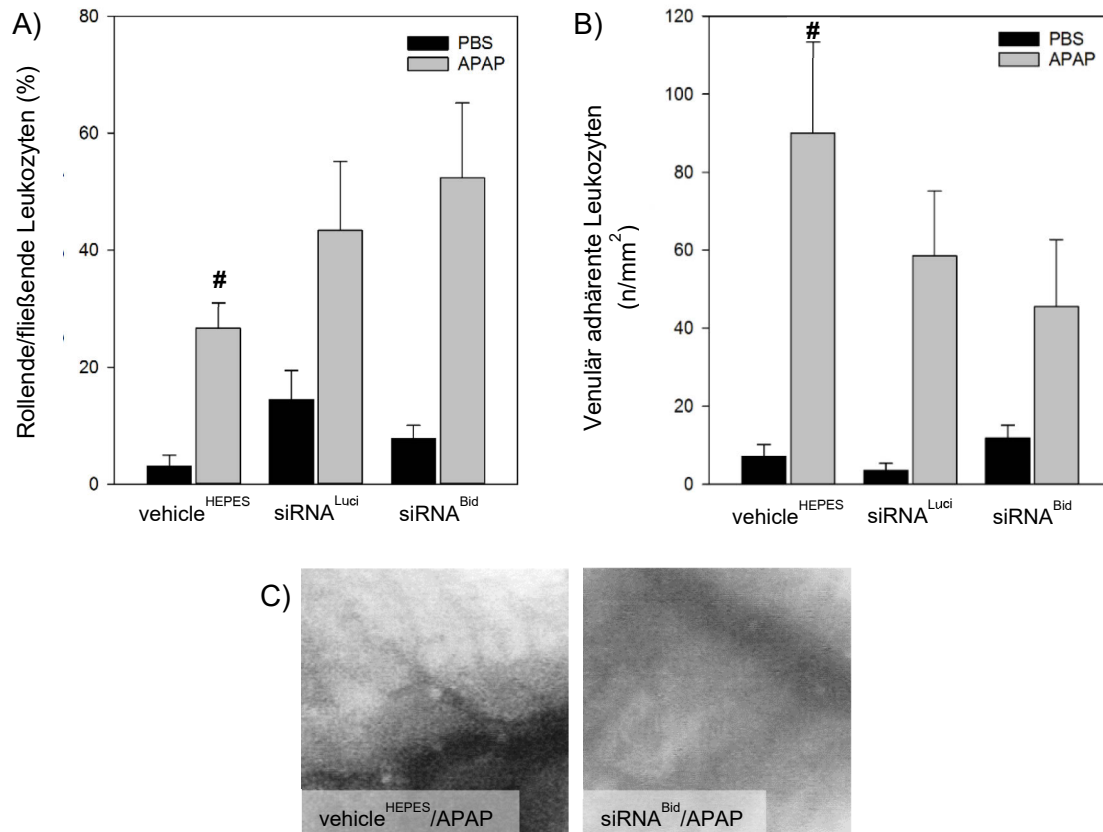


Abbildung 14: Quantitative Analyse der rollenden vs. fließenden Leukozyten in den Lebervenolen (A) sowie venulär adhärenter Leukozyten (B), jeweils mit repräsentativen intravitalmikroskopischen (IVM)-Aufnahmen (C, Vergrößerung 200x). C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur: # p < 0,05 vs. PBS.

7.2.2.2 SINUSOIDALE LEUKOZYTENSTASE

Untermuert wurden die bereits beschriebenen Leukozyteninteraktionen in den postsinusoidalen Venolen durch einen signifikanten Anstieg stagnierender Leukozyten in den Sinusoiden unter APAP-Gabe. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Vorbehandlungen in APAP-exponierten Tieren (Abbildung 15, APAP/DBTC/siRNA^{Luci} vs. APAP/DBTC/vehicle^{HEPES} vs. APAP/DBTC/siRNA^{Bid}). PBS-exponierte Lebern wiesen nur eine geringe Anzahl an adhärenenten Leukozyten unter allen Vorbehandlungen auf. In Abbildung 15 rechtsseitig sind repräsentative IVM-Aufnahmen der Versuchstiere gezeigt.

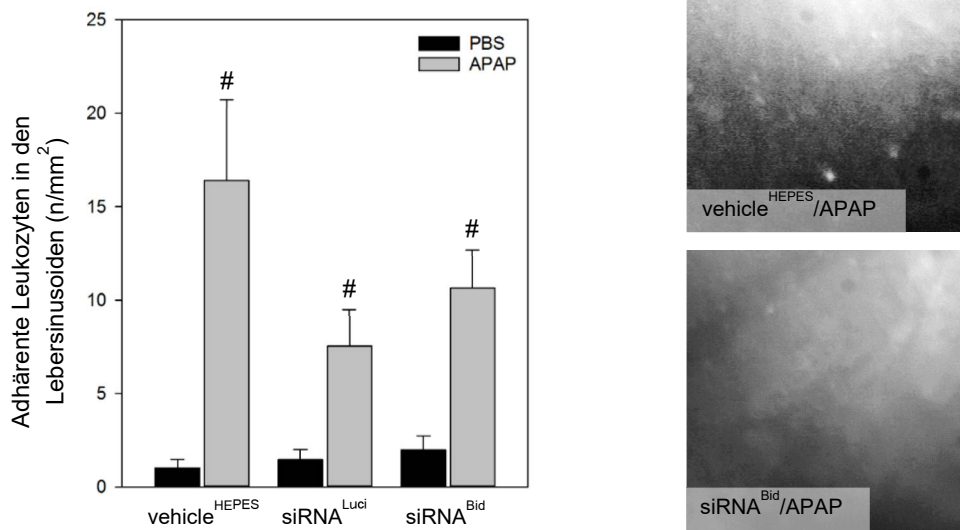


Abbildung 15: Quantitative Analyse der adhärenenten Leukozyten in den Lebersinusoiden mit repräsentativen intravitalmikroskopischen (IVM)-Aufnahmen (Vergrößerung 200x). C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur: # p < 0,05 vs. PBS.

7.2.3 DNA-FRAGMENTIERUNG

Die Induktion eines ALV mit APAP-Gabe erzeugte einen deutlichen Anstieg der DNA-Fragmentierung mit 200-300 Hepatozyten/mm² in DBTC/siRNA^{Luci} und DBTC/vehicle^{HEPES} vorbehandelten Mäusen (Abbildung 16, p<0,05 vs. PBS). Die Gabe von DBTC/siRNA^{Bid} reduzierte signifikant den APAP-assoziierten Zelltod auf gemittelt circa 70 Zellen/mm² (Abbildung 16, p<0,05 vs. PBS, DBTC/siRNA^{Luci} und DBTC/vehicle^{HEPES}). Die DNA-Fragmentierung in den PBS-exponierten Mäusen wies mit maximal 10 Hepatozyten/mm² bei allen Vorbehandlungen Normwerte auf. In Abbildung 16 rechts sind repräsentative IVM-Aufnahmen der Versuchstiere gezeigt.

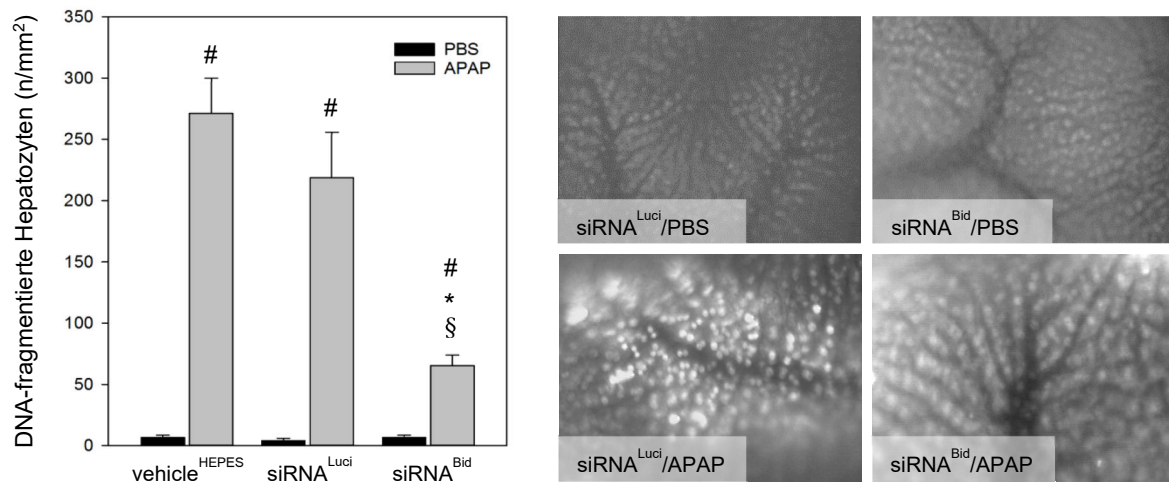


Abbildung 16: Quantitative Analyse von Hepatozyten mit DNA-Fragmentierung (links) und repräsentative intravitalmikroskopische (IVM)-Aufnahmen (Vergrößerung 200x) (rechts). C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur: [#] p < 0,05 vs. PBS; ^{*} p < 0,05 vs. DBTC/siRNA^{Luci}; [§] p < 0,05 vs. DBTC/vehicle^{HEPES}

7.3 BLUT- UND GEWEBEENTNAHME

7.3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEN

7.3.1.1 PROTEINEXPRESSION VON CLEAVED CASPASE 3, BAX UND BCL2

Zur weiteren Einordnung des Zelltodmechanismus unter APAP-Exposition wurde die gesplante (*cleaved*) Caspase 3 Expression, ebenso wie die Bax- und Bcl2-Expression unter APAP-Gabe bestimmt. Wie bereits schon in diversen anderen Studien bestätigt (Lawson et al., 1999; Gujral, 2002; El-Hassan et al., 2003; Jaeschke et al., 2006), konnte ebenfalls keine Expression der gesplanten Caspase 3 unter APAP-Gabe nachgewiesen werden. Abbildung 17 zeigt den repräsentativen Western Blot der *cleaved* Caspase 3 Bestimmung.

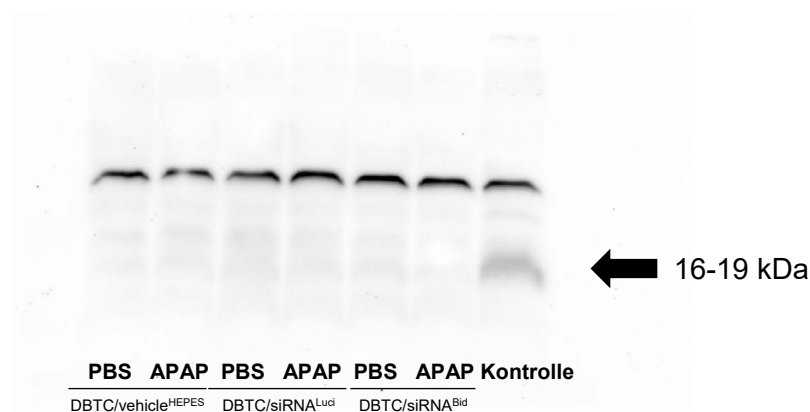


Abbildung 17: Repräsentatives Bild der *cleaved* Caspase 3 Expression mittels Western Blot.

Weiterhin wurden das proapoptotische Bax, welches u.a. durch Bid aktiviert wird, und das antiapoptotisch wirkende Bcl2-Protein, die beide ebenfalls zur Gruppe der Bcl-Proteine gehören, bestimmt. Nach der Induktion eines ALV mit APAP-Gabe zeigte sich sowohl die Bax- wie die Bcl2-Proteinexpression gegenüber den PBS-exponierten Tieren markant erhöht, was aber nicht signifikant war (n.s., Abbildung 18).

Unter *Silencing* von Bid zeigte sich die Bax-Proteinexpression signifikant reduziert gegenüber DBTC/siRNA^{Luci} in APAP-exponierten Mäusen (Abbildung 18 A, $p < 0,05$ vs. DBTC/siRNA^{Luci}). In allen PBS-Kontrollgruppen war die Bax-Proteinexpression nahezu unverändert.

Die Bcl2-Proteinexpression sank zwar tendenziell bei DBTC/siRNA^{Bid} vorbehandelten APAP-exponierten Mäusen (n.s.; Abbildung 18 B) gegenüber der Vorbehandlung mit DBTC/vehicle^{HEPES} und DBTC/siRNA^{Luci}, wobei aber keine Signifikanz erreicht wurde. Die PBS-exponierten Tiere zeigten nahezu identische Bcl2-Expressionen bei allen Vorbehandlungen (Abbildung 18 B).

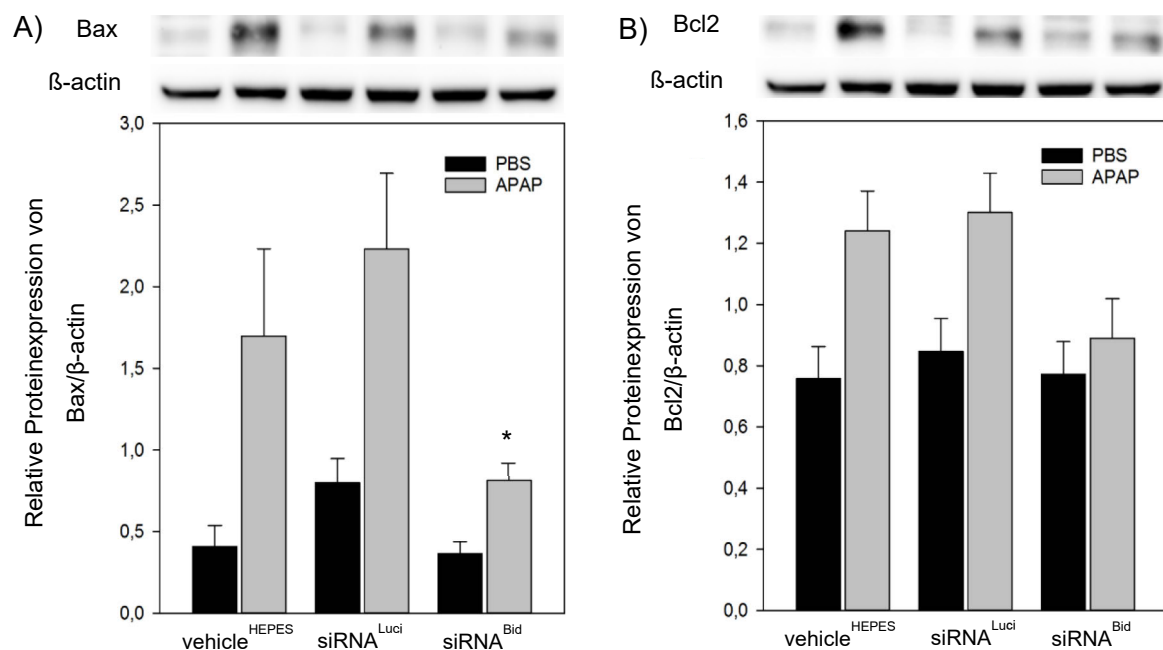


Abbildung 18: Repräsentative Western Blot Bilder und quantitative Analyse der hepatischen Proteinexpression von *Bcl-2-associated X* (Bax) (A) und *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) (B) im Lebergewebe. C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse wurden gegenüber β -actin korrigiert und sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur: * $p < 0,05$ vs. DBTC/siRNA^{Luci}

7.3.1.2 MRNA-EXPRESSION VON CYP2E1

Die Detektion der hepatischen mRNA-Expression von *cyp2e1* erfolgte zur Analyse von *Off-Target* Effekten. Unter APAP-Exposition sank in allen vorbehandelten Gruppen die relative *cyp2e1* mRNA-Expression, welche sich gegenüber PBS/DBTC/siRNA^{Luci} ($0,85 \pm 0,07$;

$p=0.007$) und PBS/DBTC/siRNA^{Bid} (0.78 ± 0.07) sogar signifikant darstellte. Dabei blieb die mRNA-Expression von *cyp2e1* in den verschiedenen vorbehandelten APAP-exponierten Tieren nahezu unverändert (Abbildung 19).

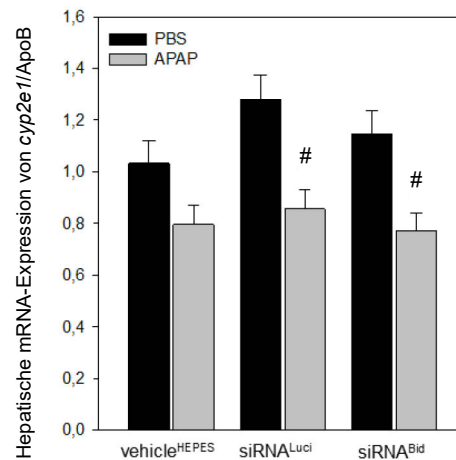


Abbildung 19: Quantitative RT-PCR Analyse der hepatischen *cyp2e1* mRNA-Expression. C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse wurden gegenüber ApoB korrigiert und sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur: # $p < 0,05$ vs. PBS

7.3.2 BESTIMMUNG DER HEPATISCHEN GSH-KONZENTRATION

Zur weiteren Abklärung eventueller *Off-Target* Effekte wurde neben der mRNA-Expression von *cyp2e1* zusätzlich die hepatische GSH-Konzentration bestimmt.

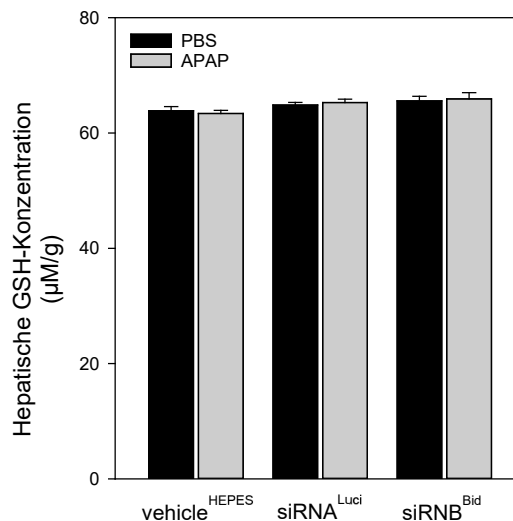


Abbildung 20: Quantitative Bestimmung der GSH-Konzentration. C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur.

Nach Induktion eines ALV mit APAP zeigten sich nahezu identische hepatische GSH-Konzentrationen gegenüber PBS-Exposition sowie unter allen Vorbehandlungen (DBTC/vehicle^{HEPES}: 6.3 ± 0.05 $\mu\text{mol/g}$; DBTC/siRNA^{Luci} 6.5 ± 0.06 $\mu\text{mol/g}$; DBTC/siRNA^{Bid}: 6.6 ± 0.1 $\mu\text{mol/g}$) (Abbildung 20).

7.3.3 BESTIMMUNG VON AST UND ALT

Die Transaminasen stellen neben anderen Parametern etablierte Laborparameter insbesondere für nekrotische Zellvorgänge beim ALV dar. Unter APAP-Exposition fand sich sowohl bei AST wie bei ALT ein deutlicher Anstieg der Transaminasen in allen drei Vorbehandlungsgruppen gegenüber PBS-Exposition (Abbildung 21, # $p < 0,05$ vs. PBS). Dieser Anstieg war unter Vorbehandlung mit DBTC/siRNA^{Bid} geringer ausgeprägt. In den Kontrollgruppen zeigten sich AST und ALT normwertig.

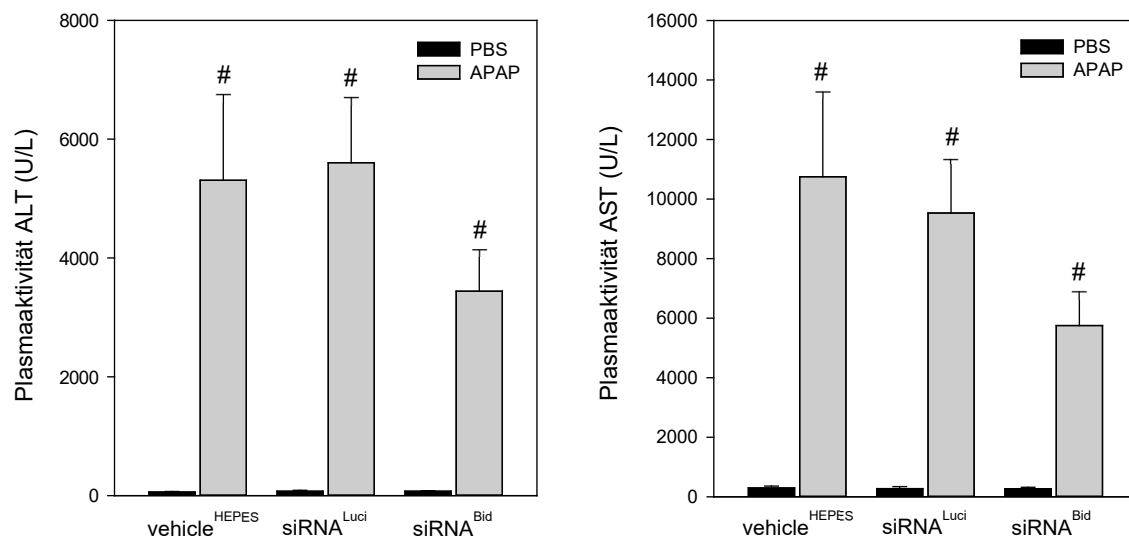


Abbildung 21: Plasmakonzentrationen von ALT und AST (ALT links, AST rechts). C57BL/6J Mäuse ($n=60$) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion ($n=30$) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion ($n=30$, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} ($n=20$) oder DBTC/siRNA^{Luci} ($n=20$) oder DBTC/vehicle^{HEPES} ($n=20$). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, post-hoc pairwise comparison Test, Bonferroni Korrektur: # $p < 0,05$ vs. PBS.

7.3.4 BESTIMMUNG VON HMGB1 UND CYPA

Zur weiteren Abklärung des Zelltodmechanismus und des Inflammationsgeschehens erfolgte mittels ELISA die Bestimmung von HMGB1 und CyPA. Beide Parameter zeigten sich nach der Induktion eines ALV unter APAP-Gabe signifikant erhöht (Abbildung 22, $p < 0,05$ vs. PBS). Unter der Vorbehandlung mit DBTC/siRNA^{Bid} nahm die HMGB1 Konzentration signifikant ab (Abbildung 22 links; $p < 0,05$ vs. siRNA^{Luci}), während die CyPA Konzentration nur tendenziell rückläufig war (Abbildung 22 rechts, n.s.). Unter PBS-Gabe waren die Konzentrationen von sowohl HMGB1 wie auch von CyPA nahezu unverändert und erreichten Normwerte bei allen Vorbehandlungen.

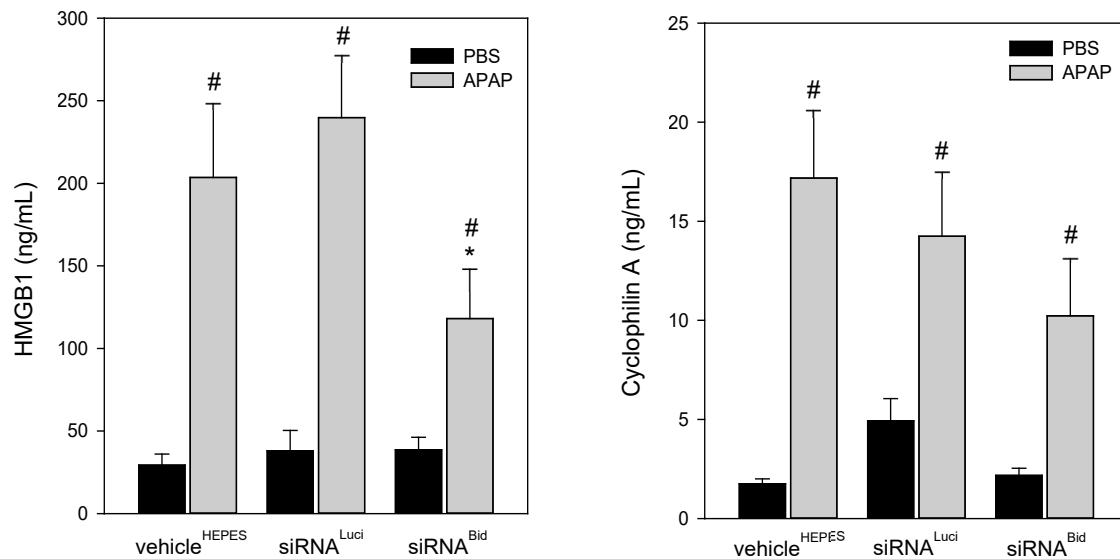


Abbildung 22: Plasmakonzentrationen von HMGB1 (links) und von CyPA (rechts). C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, *post-hoc pairwise comparison* Test, Bonferroni Korrektur: # p < 0,05 vs. PBS, * p < 0,05 vs. DBTC/siRNA^{Luci}.

7.3.5 HISTOLOGIE: NEKROSEAREALE

Um die nekrotischen Leberareale darzustellen erfolgte die Anfärbung mit H&E. Nekrose ist charakterisiert durch eine vermehrte Eosinophilie des Zytoplasmas, Karyolyse und Auflösung der Zellstruktur durch Zerstörung der Zellmembranen. Die Auswertung der Nekroseareale erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 40x). Repräsentative histologische Aufnahmen der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 23 (rechts) dargestellt. Es zeigte sich, dass die Nekroseanteile im Lebergewebe nach Induktion eines ALV durch APAP-Gabe im Vergleich zur PBS-Gabe signifikant ansteigen (Abbildung 23 links). Unter DBTC/siRNA^{Bid}-Vorbehandlung in APAP-behandelten Mäusen konnten die Nekroseareale im Vergleich zu DBTC/siRNA^{Luci}- und DBTC/vehicle^{HEPES}-Vorbehandlung signifikant reduziert werden (Abbildung 23 p < 0,05 vs. PBS; p < 0,05 vs. DBTC/siRNA^{Luci} und vs. DBTC/vehicle^{HEPES}). Unter PBS-Gabe waren Nekroseareale bei allen Vorbehandlungen kaum zu detektieren.

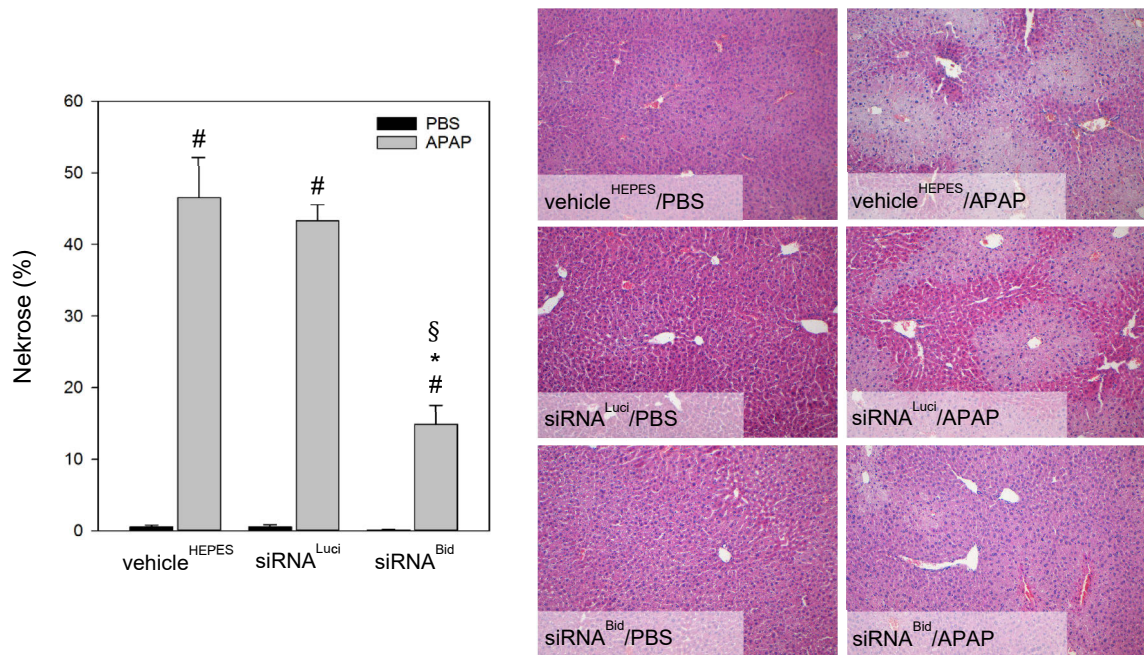


Abbildung 23: Quantitative Analyse von nekrotischen Gewebearealen (in %, links) mit repräsentativen Hämatoxylin&Eosin (H&E)-gefärbten Leberausschnitten (rechts, Vergrößerung lichtmikroskopisch 40x). C57BL/6J Mäuse (n=60) erhielten 48 h vor der Acetaminophen (APAP) Injektion (n=30) oder der phosphate-buffered saline (PBS) Injektion (n=30, 300 mg/kg Körpergewicht pro Maus intraperitoneal (KG i.p.)) ein leberspezifisches siRNA Zustellungssystem mit DBTC/siRNA^{Bid} (n=20) oder DBTC/siRNA^{Luci} (n=20) oder DBTC/vehicle^{HEPES} (n=20). Die Mäuse wurden 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition untersucht (+6 h). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; ANOVA, *post-hoc pairwise comparison* Test, Bonferroni Korrektur: [#] p < 0,05 vs. PBS; ^{*} p < 0,05 vs. DBTC/siRNA^{Luci}; [§] p < 0,05 vs. DBTC/vehicle^{HEPES}.

7.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die Hypothese des selektiven organspezifischen Bid-Silencing durch die Gabe von DBTC/siRNA^{Bid} wurde durch eine signifikante Reduktion der Bid-Proteinexpression mittels Western Blot in der Leber bestätigt (Abbildung 11). Untermauert wurde dies durch eine signifikant erniedrigte hepatische *bid*-mRNA Expression (Abbildung 12).

Mittels der IVM konnte bei APAP-exponierten Mäusen durch siRNA^{Bid}-Vorbehandlung ein Schutz vor Apoptose mit signifikant erniedrigter DNA-Fragmentierung der Zellen (Abbildung 16) erreicht werden. Außerdem verbesserte sich darunter tendenziell die Perfusion (Abbildung 13), wobei aber die Inflammation keine Veränderung zeigte (Abbildung 14, Abbildung 15). Weiterhin zeigte sich unter Vorbehandlung mit siRNA^{Bid} ein Schutz vor dem nekrotischen Zelltod in Form von tendenziell erniedrigten Transaminasen (n.s., Abbildung 21) sowie signifikant erniedrigten nekrotischen Arealen (Abbildung 23). Dazu passend war der Nekroseparameter HMGB1 signifikant erniedrigt (Abbildung 22). *Off-target* Effekte unter APAP-induziertem ALV durch die Vorbehandlungen mit DBTC/siRNA konnten 6 h nach APAP- oder PBS-Exposition nahezu ausgeschlossen werden (Abbildung 19, Abbildung 20).

8. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Bid-Proteins, dessen Expression spezifisch in den Hepatozyten mittels siRNA herabreguliert wurde, experimentell im Mausmodell eines durch APAP-induzierten ALV untersucht.

8.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN

8.1.1 TIERMODELL UND CHIRURGISCHES VORGEHEN

Für die Tierversuche wurden männliche C57BL/6J-Mäuse mit 20-30g KG im Alter zwischen 6-8 Wochen verwendet. Um Schwankungen bezüglich des unterschiedlichen Körpergewichtes auszugleichen, wurden alle folgenden Applikationen (APAP und PBS) gewichtsadaptiert durchgeführt. In Studien von Jaeschke et al., 2006 wurden die GSH-Konzentrationen durch Fasten am Tag vor der APAP-Gabe reduziert. In dieser Arbeit wurde ebenfalls nach diesem Studiendesign verfahren. Alle Versuche erfolgten verblindet. Erst nach Abschluss der Auswertungen erfolgte die Entblindung des Experimentators.

Um eine chirurgische Präparation vornehmen zu können, erfolgte die Anästhesie der C57BL/6J-Mäuse nach einem standardisierten Protokoll mit Ketamin und Xylazin (Arras et al., 2001). Aufgrund intraindividuelle Unterschiede, wie bspw. unterschiedlicher Körpergewichte der Mäuse, wurde mit einem gewichtsadaptierten Protokoll gearbeitet. Neben dem Körpergewicht mussten weitere physiologische Parameter für eine ausreichende Anästhesie berücksichtigt werden. Dazu gehörte die Atmung, die Sauerstoffversorgung und die Durchblutung (Mempel et al., 2004; Kuchmiy et al., 2012). Außerdem erfolgte die Lagerung auf einer Wärmeplatte, um Schwankungen der Körpertemperatur zu vermeiden.

Um im weiteren Verlauf die IVM durchführen zu können, wurde eine chirurgische Präparation der Vena jugularis externa zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe für die IVM durchgeführt. Daran schloss sich die Präparation der Leber an. Durch solche chirurgischen Interventionen können aufgrund notwendiger Organumlagerungen in den Geweben Einblutungen oder Perfusionsdefizite entstehen, welche zu verfälschten Ergebnissen, durch bspw. ausgelöste Immunreaktionen oder fehlende Mikrozirkulation, führen (Mempel et al., 2004). Es wurde darauf geachtet, die Leber behutsam umzulagern und mit NaCl-Lösung zu befeuchten, um Gewebetraumata und einer Austrocknung während der Darstellung vorzubeugen.

Bei der IVM sind ebenfalls in- und expiratorische Bewegungen, der Herzschlag sowie die arterielle Pulsation, Muskelkontraktionen und die Atmung zu berücksichtigen. Hierzu wurde

behutsam das Gewebe fixiert und auf eine ausreichende Anästhesie geachtet, um den Einfluss der o.g. Parameter gering zu halten (Pittet und Weissleder, 2011).

8.1.2 INTRAVITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE (IVM)

Für die *in vivo*-Analyse des sinusoidalen Perfusionsversagens, der intrahepatischen Leukozyteninteraktionen und der Auswertung der Zellen mit DNA-Fragmentierung wurde die IVM, wie zuvor beschrieben, 6 h nach der APAP-Exposition in Ketamin-Xylazin-anästhesierten Tieren durchgeführt. Durch die Epi-Illuminationstechnik der IVM können große Leberbereiche dargestellt werden (Menger et al., 1991; Lehr et al., 1999). Durch die Möglichkeit der Speicherung der IVM Aufnahmen bspw. auf einer DVD können Perfusionsausfälle, Sinusoidweiten, Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und DNA-fragmentierte Zellen (Menger et al., 1991; Vollmar et al., 1996) noch nach erfolgter IVM ausgewertet werden (Kuchmiy et al., 2012). Die IVM stellt somit beim durch APAP-verursachten Leberversagen eine optimale Untersuchungsmethode dar. Bei der anschließenden Auswertung erfolgte eine mäanderförmige Begutachtung der Leberläppchen um Auswirkungen der beschriebenen regionalen Heterogenität des Zellschadens (Tanaka et al. 2014), der unterschiedlich stark betroffene Bereiche der Leber erkennen lässt, möglichst gering zu halten.

Um die DNA-fragmentierten Zellen, die Leukozyteninteraktionen und die Mikrozirkulation unter dem IVM sichtbar zu machen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe, wie bereits in anderen Studien beschrieben, verwendet (Kuhla et al., 2015). In dieser Arbeit wurden Natriumfluoreszin, Rhodamin-6G und Bisbenzimid eingesetzt. Diese Fluoreszenzfarbstoffe können in lebenden Organismen durch Andocken an andere Zellen/Proteine oder unter Einfluss von UV-Licht (sog. fototoxische Effekte) zu verfälschten Ergebnissen, bspw. durch vermehrte Leukozyteninvasion führen (Janssen et al., 1994; Steinbauer et al., 2000; Saetzler et al., 1997). Aufgrund dessen wurden bereits erprobte und gängige Fluoreszenzfarbstoffe mit geringer Masse (Vollmar und Menger, 2009, Kuhla et al., 2015) unter standardisierter gewichtsadaptierter Gabe verwendet, sodass der Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit als vernachlässigbar einzuschätzen ist (Steinbauer et al., 2000). Dadurch konnte auch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander wie auch zu anderen Arbeiten erreicht werden. Derzeit liegen keine Studien zu Interaktionen von den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen mit dem verwendeten APAP vor.

8.1.3 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Neben den IVM Aufnahmen erfolgten laborchemische, molekularbiologische und histologische Untersuchungen. Laborchemisch wurden, wie auch in der Klinik üblich, die Plasmaaktivitäten von ALT und AST bei der Leberschädigung bestimmt. Die Höhe der

Transaminasenwerte korreliert dabei mit dem Ausmaß und dem Schweregrad des Leberschadens (McGill et al., 2013). Da AST größtenteils in den Mitochondrien vorkommt, wird dieses erst bei schweren Leberschädigungen freigesetzt, wohingegen das im Zytoplasma vorkommende ALT schneller bei leichten Schädigungen ansteigt. In dieser Arbeit zeigten sich beide Transaminasen unter APAP-Intoxikation massiv erhöht, sodass von einem schweren hepatischen Schaden auszugehen ist. Weiterhin zeigten sich die Konzentrationen von HMGB1 und CyPA als weitere Marker insbesondere für nekrotische Zelluntergänge stark erhöht. Im Gegensatz zu ALT ist HMGB1 sensitiver für Zellschäden und Nekrose und erlaubt eine genauere Aussage über die Schwere des Leberschadens des Patienten (Antoine et al., 2012). Bisher hat dieses aber noch keinen Einzug in den klinischen Alltag gefunden. Die nekrotischen Leberareale wurden schließlich mit angefertigten Paraffin-Schnitten histologisch beurteilt. Um untersucherabhängige Fehler zu vermeiden, war der Experimentator zum Zeitpunkt der gesamten Auswertung verblindet.

Weitere molekularbiologische Untersuchungen zur Einordnung des Zelltodes, zur Klärung des Erfolges des spezifischen Bid-*Silencing* sowie zur Detektion von *Off-Target* Effekten erfolgten mit Western Blots und RT-PCR. Um bei der sehr spezifischen und sensitiven RT-PCR die Kontaminationsgefahr besonders während der Aufreinigungsphase mit anderen DNA- oder RNA-Spuren gering zu halten, erfolgte die Durchführung in einem dafür vorgesehenen Labor unter sterilen Bedingungen und unter Anwendung der in jedem Assay entsprechend mitgeführten Kontaminationskontrollen (Bustin und Mueller, 2005).

8.2 DISKUSSION DER PATHOPHYSIOLOGIE DES APAP-INDUZIERTEN ALV

Die Leber wird oft wegen ihrer detoxifizierenden Funktion als Entgiftungsorgan bezeichnet. Sie ist deshalb häufig von Schädigungen durch unterschiedliche Noxen betroffen (siehe Abbildung 1). Die Hauptursache für ALV in westlichen Ländern und Industrienationen ist die Intoxikation durch APAP (Rutter et al., 2018). Bei einem APAP-induzierten ALV kommt es zu einer komplexen Immun- und Entzündungsreaktion des Organs, die sich auf den gesamten Organismus auswirkt und durch eine massive Inflammation, einen Perfusionsverlust, Apoptose- und Nekrosevorgänge charakterisiert ist. Gerade die Leber ist aufgrund ihrer Zell- und Rezeptorvielfalt aktiv an der Entstehung der Organdysfunktion beteiligt. Die Pathogenese der hepatozellulären Dysfunktion unter APAP-Intoxikation ist jedoch bis heute noch nicht vollständig geklärt (Cohen und Khairallah, 1997; Jaeschke et al., 2012a).

8.2.1 MIKROZIRKULATION

Zunächst wurde die Mikrozirkulation als charakteristischer Parameter beim APAP-induzierten ALV untersucht (Thiel et al., 2017). Hepatozyten haben aufgrund ihrer hohen Biosynthese-, Sekretionsleistungen und Speicherfunktionen einen hohen Energiebedarf an ATP, dessen Synthese einer intakten Atmungskette bedarf (Rolfe und Brown, 1997). Unter Hypoxiebedingungen, bspw. durch toxische Metaboliten, kommt es zu massiven irreversiblen zellulären Schäden, die mit Energiereservoirdepletionen einhergehen können (Lemasters, 1999; Paxian et al., 2003; Crimi et al., 2006). Es entsteht ein Zusammenspiel aus überwiegender Vasokonstriktion, einer Hyperkoagulabilität, verschlechterten Fließeigenschaften der Blutbestandteile und einem Endothelödem (Vollmar und Menger, 2009), was die Mikrozirkulation stark einschränkt. Aufgrund dieser Faktoren kann es zudem zur Ausbildung von Mikrothromben kommen (Spronk et al., 2004), welche letztendlich das Perfusionsdefizit noch verstärken und mit weiteren Faktoren zum ALV führen können. Hierbei sind insbesondere die Lebersinusoiden aufgrund ihrer Architektur und Größe betroffen. Unter APAP-Gabe wurde in dieser Arbeit ein signifikantes Perfusionsdefizit von 33% gefunden. Andere Studien beschreiben jedoch ausgeprägtere Mikrozirkulationsstörungen (Kuhla et al., 2015; Ito et al., 2003). Diese sind meist bereits sehr früh zu Beginn des ALV detektierbar (Ito et al., 2003). In dieser Arbeit bleibt allerdings offen, weshalb die Perfusion nicht hochgradig eingeschränkt ist, während sich doch deutlich inflammatorische, sowie apoptotische und nekrotische Zellvorgänge detektieren lassen.

8.2.2 INFLAMMATION

Neben dem Perfusionsdefizit ist die Inflammation beim durch APAP-verursachten ALV ebenfalls beschrieben (Kubes und Mehal, 2012; Ramachandran und Jaeschke, 2018). Durch die Entzündungsreaktion kommt es bei den Endothelzellen der Leber zu einer Präsentation von verschiedenen Adhäsionsmolekülen. Aufgrund der Verlangsamung der Leukozytenpassage in den postsinusoidalen Lebervenenolen entwickelt sich eine zunehmende Anhaftung der Leukozyten an das Endothel (Vollmar und Menger, 2009; Jaeschke et al., 2006). Dies führt zu dem sogenannten Leukozyten „rolling“-Phänomen (Vollmar und Menger, 2009). Dieses Leukozytenrolling konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei den Versuchstieren nach Induktion des ALV mit APAP intravitalmikroskopisch mit signifikanten Erhöhungen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich signifikante Erhöhungen der venulären Leukozytenadhärenz und eine signifikante Zunahme der Leukozytenstase in den Sinusoiden, was sich durch die stärker werdenden Interaktionsvorgänge zwischen leukozytären und endothelialen Rezeptoren erklären lässt und in anderen Studien ebenfalls beschrieben wurde (Vollmar und Menger, 2009;

Jaeschke et al., 2006; Ramaiah, 2007). Abschließend kommt es dann zu einer mechanischen Blockade der Gefäße durch adhärente Leukozyten. Dies führt zu einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion in den Sinusoiden und einem Einwandern der Leukozyten in das Lebergewebe (Vollmar und Menger, 2009; Jaeschke et al., 2006; Ramaiah, 2007).

Neben der lokalen Entzündung wird beim ALV unter APAP-Exposition auch eine systemische Inflammation verursacht, welche in eine sterile und nicht-sterile Form der Inflammation unterschieden wird (Kubes und Mehal, 2012; Ramachandran und Jaeschke, 2018). Mehrere Studien haben gezeigt (James et al., 2003; Williams et al., 2010a; 2010b; Jaeschke et al., 2011a), dass eine nicht-sterile Entzündung, beispielweise dargestellt durch Infiltration von Entzündungszellen, bei APAP-induzierten Leberschäden auftritt (James et al., 2003; Williams et al., 2010a; 2010b; Jaeschke et al., 2012a; Ramachandran und Jaeschke, 2018). Obwohl APAP-induzierte proinflammatorische Mediatoren Entzündungszellen (Neutrophile, Monozyten) in die Leber rekrutieren, konnte eine direkte Zytotoxizität der nicht-sterilen systemischen Inflammation im Pathomechanismus des APAP-induzierten ALV nicht sicher nachgewiesen werden, vielmehr scheint der regenerative Aspekt im Vordergrund zu stehen (James et al., 2003; Jaeschke et al., 2012a; Ramachandran und Jaeschke, 2018). Deshalb wurde die nicht-sterile Entzündung in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

Auf der anderen Seite beschreiben viele Studien, dass die APAP-induzierte Leberpathologie durch eine keimfreie, sogenannte sterile Entzündung gekennzeichnet ist, bei der die angeborene Immunantwort durch pathogen abgeleitete Moleküle wie HMGB1 (Laskin, 2009; Jaeschke et al., 2012b) aktiviert wird. So zeigt durch APAP-verursachte Nekrose deutliche Anzeichen einer Entzündungsreaktion und eine massive Freisetzung von DAMPs (Ramachandran und Jaeschke, 2018). Die vorliegende Arbeit bestätigte nun eine sterile Inflamationsreaktion unter APAP-Exposition durch eine signifikant erhöhte HMGB1 Plasmakonzentration.

Insgesamt zeigten sich in dieser Arbeit beim APAP-induzierten ALV Aspekte einer sterilen Inflammation wie erhöhte HMGB1 Konzentrationen ebenso wie Aspekte einer hepatischen Entzündungsreaktion wie Leukozytenakkumulation in den Sinusoiden bzw. postsinusoidalen Venolen, sodass vermutlich sowohl sterile wie nicht-sterile Inflamationsformen bei APAP-induziertem ALV nebeneinander zu existieren scheinen. Diese Koexistenz wurde ebenfalls in anderen Studien beobachtet, wobei die sterile Inflamationsreaktion im APAP-induzierten ALV größere Auswirkungen auf die Hepatotoxizität zu haben scheint (Jaeschke et al., 2012a; 2012b).

8.2.3 APOPTOSE UND NEKROSE

Unter Inflamationsreaktionen und einem Perfusionsversagen kommt es im Verlauf zu einem Untergang der Hepatozyten. Dabei gibt es unterschiedliche Zelltodmechanismen. Die Apoptose ist der selbstinduzierte Zelltod bei eukaryotischen Zellen. Sie ermöglicht es dem Organismus unerwünschte oder gealterte Zellen zu entfernen (Steller, 1995). Durch eine hohe Rezeptordichte ist die Leber ein Organ, welches sehr empfänglich für Apoptosesignale ist (Yoon und Gores, 2002). Viele Lebererkrankungen, wie u.a. die alkoholische Hepatitis, sind mit signifikant erhöhter Apoptose assoziiert (Kawahara, 1994), welche mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Natori et al., 2001). Typische Merkmale der Apoptose sind morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfen, DNA-Fragmentierung und Membran-Aufkeimung (Elmore, 2007).

In dieser Arbeit wurde eine signifikant erhöhte DNA-Fragmentierung der Leberzellen unter APAP-Exposition nachgewiesen. Weiterhin zeigten sich tendenziell erhöhte proapoptotische Bax- und ebenfalls auch erhöhte antiapoptotische Bcl2-Proteinexpressionen, wobei bei beiden Parametern aber keine Signifikanz erreicht wurde. Dies verstärkt die Hypothese, dass es sich bei dem vorliegenden Zelltodmechanismus nicht ausschließlich um Apoptose handelt. Diese Annahme wurde durch das Ausbleiben der gespaltenen Caspase 3 Proteinexpression als eines der Hauptmerkmale bei der Apoptose bekräftigt, was bereits durch viele andere Studien belegt wurde (Lawson et al., 1999; Gujral, 2002; El-Hassan et al., 2003; Jaeschke et al., 2006). Eine mögliche Erklärung dessen ist, wie einige Studien zeigten, dass sich Apoptose zu Nekrose entwickeln kann (Vollmar und Menger, 2009; Karch und Molkentin, 2015). Durch Perfusionsversagen und Inflamationsreaktionen kommt es zunehmend zu Funktionseinschränkungen der Hepatozyten. Da bei der APAP-Exposition mitochondriale Proteine besonders betroffen sind (Nelson, 1990; Cohen und Khairallah, 1997; Jaeschke et al., 2013; McGill und Jaeschke, 2013), entsteht eine Beeinträchtigung der Atmungskette und oxidativer Stress. Sind dann die ATP Reserven der Leber erschöpft, kommt es zu Hypoxiebedingungen. Diese können zytotoxische Effektormechanismen auslösen (Badmann et al., 2012; Thiel et al., 2017) und so auch zur Nekrose führen. Dabei werden Übergänge zum nekrotischen Zelltod vor allem bei unzureichenden Energiereservoirs möglich, da Apoptose ATP benötigt. Beim durch APAP-induzierten ALV kann also davon ausgegangen werden, dass die Zellen womöglich von der Apoptose zur Nekrose wechseln könnten und somit zum apoptotischen (bei noch ausreichendem ATP Vorrat in der Zelle) und nekrotischen Zelltod (bei fehlendem ATP Angebot) beitragen (Vollmar und Menger, 2009).

Diese Hypothese unterstützend zeigten sich bei APAP-exponierten Mäusen in dieser Arbeit signifikante Erhöhungen der Plasma-AST- und ALT-Aktivitäten als typische Nekroseparameter. Obwohl besonders männliche Mäuse, wie in dieser Arbeit verwendet,

anfällig für APAP-induziertes ALV sind und signifikant höhere Anstiege der Plasma-AST- und ALT-Aktivität als weibliche Mäuse aufweisen können (Mohar et al., 2014), waren außer den Transaminasen aber auch die Plasmakonzentrationen von HMGB1 und CyPA als Marker der Nekrose bei APAP-Exposition signifikant erhöht, was für eine Aktivierung des nekrotischen Zelltodes spricht (Lawson et al., 1999; Gujral, 2002; El-Hassan et al., 2003; Jaeschke et al., 2006). Weiterhin wurden in dieser Arbeit große und zusammenhängende Bereiche von nekrotischem Gewebe histologisch detektiert. Deshalb ist davon auszugehen, dass Nekrose als zusätzlicher Zelltodmechanismus bei der APAP-Intoxikation auftritt.

Beide Zelltodformen sind also nicht, wie ursprünglich vermutet, klar voneinander trennbar (Lemasters, 1999; Malhi et al., 2006). Weitere Überschneidungen der beiden Zelltodformen zeigen sich sowohl in den Aktivierungsmechanismen als auch bei der Signalübertragung oder bspw. bei der DNA-Fragmentierung der Zellen (Karch und Molkentin, 2015; Jaeschke et al., 2012a). Diese Zellen wurden bisher vor allem der Apoptose zugeordnet (Karch und Molkentin, 2015; Jaeschke et al., 2012a). Allerdings werden eben diese Zellen mit DNA-Fragmentierung auch unter bestimmten Formen der Nekrose beschrieben (Jaeschke et al., 2012a; Karch und Molkentin, 2015).

Zudem wurde in mehreren Studien im Rahmen der regulierten Nekrose unter APAP-Exposition z.B. die Translokation von Bid und Bax beschrieben (Irrinki et al., 2011; Whelan et al., 2012; Karch et al., 2013; Karch und Molkentin, 2015). Diese Proteine wurden zunächst der Apoptose zugeschrieben, scheinen nun aber bei der Nekrose ebenfalls an Bedeutung zu gewinnen (Irrinki et al., 2011; Whelan et al., 2012; Karch et al., 2013; Karch und Molkentin, 2015). Deshalb könnte der deutliche Anstieg der Bax-Proteinexpression unter APAP-Gabe ebenso darauf hinweisen, dass APAP-induziertes ALV durch nekrotische Signale gekennzeichnet ist.

Während die Nekrose bisher als Form des unregulierten Zelltodes galt, belegen neuere Studien, dass Nekrose auch eine Form des regulierten Zelltodes in erwachsenen Wirbeltierorganismen sein kann (Karch und Molkentin, 2015). Bis heute wird die vorherrschende Form des Zelltods bei APAP-induziertem ALV mit Berichten über Apoptose, Nekrose, onkotische Nekrose, regulierte (programmierte) Nekrose, Nekroptose, Ferroptose und Pyroptose diskutiert (Jaeschke et al., 2019; Ramachandran und Jaeschke, 2018; Gujral, 2002; Jaeschke und Lemasters, 2003; Kon et al., 2004; Jaeschke et al., 2019; Shojaie et al., 2020). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit und basierend auf der neusten Literatur (Jaeschke et al., 2019, Jaeschke und Ramachandran, 2020, Shojaie et al., 2020) weist der durch eine APAP-Gabe in Mäusen induzierte Zelltod alle Merkmale einer regulierten Nekrose auf und rechtfertigt somit die Annahme einer regulierten Nekrose als Hauptursache des Zelltodes unter APAP-Intoxikation. Wie

beschrieben (Abschnitt 5.2.3), hat jeder der anderen Zelltod-Modi, einschließlich Apoptose, Nekroptose, Ferroptose oder Pyroptose, Merkmale, die bei einer APAP-Intoxikation nicht vollständig erfüllt werden. APAP-induzierte Hepatotoxizität wird somit also höchst wahrscheinlich durch eine regulierte Nekrose hervorgerufen (Jaeschke et al., 2019, Jaeschke und Ramachandran, 2020, Shojaie et al., 2020).

Um effektive therapeutische Strategien beim APAP-induzierten ALV zu entwickeln, ist aber die Form des Zelltodes nicht entscheidend (Jaeschke et al., 2019), es sollte sich vor allem auf die kritischen Pathomechanismen unter APAP-Intoxikation konzentriert werden.

8.3 DISKUSSION DES THERAPEUTISCHEN POTENTIALS VON BID UND siRNA BEIM APAP-INDUZIERTEN ALV

8.3.1 siRNA-THERAPIE UND DBTC/siRNA^{BID}-GABE BEIM APAP-INDUZIERTEN ALV

Da nahezu jedes Gen durch siRNAs modifiziert werden kann und die siRNAs daher großes therapeutisches Potential haben, wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine siRNA verwendet. SiRNAs werden heutzutage in der therapeutischen Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt und gewinnen einen immer größeren Stellenwert bei der Erforschung neuer Therapieoptionen.

Mehrere Lipid-Nanopartikel für die Verabreichung von Oligonukleotiden befinden sich derzeit in der präklinischen und klinischen Entwicklung (Kulkarni et al., 2018; Nikam und Gore, 2018) und das erste siRNA-Lipid-Nanopartikel wurde im August 2018 von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* zugelassen (Setten et al., 2019). Durch die Möglichkeit der subkutanen Verabreichung sind sie sichere und wirksame therapeutische Verbindungen (Huang et al., 2018; Springer und Dowdy, 2018; Setten et al., 2019).

Es fehlten aber therapeutische Ansätze mit siRNAs *in vivo* bei der APAP-Intoxikation, denn bisher war die Wirksamkeit der systemischen siRNA Applikationen *in vivo* durch verschiedene Faktoren limitiert. So hat die siRNA im Blut nur eine unzureichende Stabilität und wird schnell abgebaut, sodass ein Erreichen des Zielortes oft kaum gelingt (Huang et al., 2011) und die siRNAs daher für therapeutische Zwecke nur begrenzt eingesetzt werden konnten (Jiang et al., 2012). Außerdem gibt es sogenannte *Off-target* Effekte (Scaggiante et al., 2011), die ein Andocken an andere Moleküle als das Zielmolekül definieren und so ebenfalls dazu beitragen, dass das Zielmolekül der siRNA seltener erreicht wird. Um diese Nachteile zu verhindern, wurde an organspezifischen Zustellungssystemen geforscht, die gezielt nur bestimmte Zellen bzw. Moleküle ansprechen.

In dieser Arbeit wurde ein durch *Silence Therapeutics GmbH* entwickeltes leberspezifisches Zustellungssystem (DBTC), welches bereits erfolgreich, sowohl *in vitro* durch die Firma, wie auch *in vivo* getestet wurde (Abshagen et al., 2015), angewandt.

Diese leberspezifische Wirkstoffkombination von DBTC und siRNA wurde in einer früheren Studie bei der Stilllegung der Fas-Expression 48 h vor der Induktion des ALV (Kuhla et al., 2015) verwendet und zeigte einen Schutz vor apoptotischem und nekrotischem Zelltod sowie mikrozirkulatorischer Dysfunktion. Daher wurde in dieser Arbeit auch nach diesem Studiendesign verfahren und die Vorbehandlung mit DBTC/vehicle^{HEPES}, DBTC/siRNA^{Luci} sowie DBTC/siRNA^{Bid} 48 h vor der APAP-Gabe zur Induktion eines ALV durchgeführt.

8.3.2 THERAPEUTISCHES POTENTIAL DES BID-SILENCING BEIM APAP-INDUZIERTEN ALV

Bereits in anderen Studien wurde sich bei APAP-induziertem ALV auf die Bcl-Proteinfamilie spezialisiert, zu der unter anderem auch das Bax- und das Bid-Protein zählen (Badmann et al., 2012; Bajt et al., 2008). So wurde bereits eine Reduzierung des hepatischen Zellschadens beim ALV unter APAP-Exposition bei Bid-*knock-out* Mäusen beschrieben (Badmann et al., 2012). Zudem zeigten *in vitro* Studien mit Bid-*Silencing* (Badmann et al., 2012) eine Protektion der Leber unter APAP-Gabe.

Neben dem Bid-Protein zählt zur Bcl-Familie ebenfalls das Bax-Protein. Unter APAP-Intoxikation und Bax-Inhibition zeigten Bajt et al. 2008, dass 6 h nach APAP-Exposition Bax-*knock-out* Mäuse den maximalen Schutz haben. Aufgrund des eng miteinander verwandten Pathomechanismus von Bid und Bax sind ähnliche Effekte auch unter Bid-*Silencing* zu erwarten. Deshalb wurde auch das weitere Studiendesign mit der Analyse des Parenchymschadens in Übereinstimmung mit dieser Studie durchgeführt. Weiterhin zeigten Bajt et al., 2008, dass Bax-*silenced* Mäuse einen Schutz vor APAP-induziertem ALV haben (Bajt et al., 2008). Demnach könnte eine signifikant reduzierte Bax-Proteinexpression beim Bid-*Silencing* auch zu dem abgeschwächten Leberschaden beigetragen haben. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Bax und vor allem auch Bid eine entscheidende Rolle bei APAP-Intoxikation spielen und dass die Hemmung des Bid-Pfades therapeutisches Potenzial zur Reduktion des APAP-bedingten ALV hat.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit ein Ansatz ohne Gen-*knock-out in vivo* durchgeführt. So führte die Verabreichung der leberspezifischen DBTC/siRNA^{Bid} nach einmaliger systemischer Applikation zur Aufnahme in die Hepatozyten und zur Herabregulation des Bid-Proteins nicht nur in den PBS- sondern vor allem in den APAP-exponierten Mäusen. Es reichte eine etwa 70%ige Reduktion der Bid-Proteinexpression aus, um die APAP-induzierte Leberschädigung signifikant zu vermindern.

Die Ergebnisse wurden durch eine signifikant reduzierte Anzahl der Bisbenzimid-gefärbten Zellen mit DNA-Fragmentierung beim Bid-*Silencing* bestätigt. Diese Zellen wurden bisher vor allem der Apoptose zugeordnet (Karch und Molkentin, 2015; Jaeschke et al., 2012a), genauso wie das Protein Bax vorrangig dem apoptotischen Zelltod zugeordnet wurde (Karch et al., 2013; Karch und Molkentin, 2015). Allerdings werden in mehreren Studien

eben diese Zellen mit DNA-Fragmentierung auch unter bestimmten Formen der Nekrose beschrieben (Jaeschke et al., 2012a; Karch und Molkentin, 2015), genauso wie das Bax-Protein immer größeren Stellenwert im Bereich des nekrotischen Zelltodes bekommt (Irrinki et al., 2011; Karch et al., 2013; Karch und Molkentin, 2015). Neben der vermeintlichen Reduktion der Apoptose durch eine signifikante Reduktion der Zellen mit DNA-Fragmentierung sowie eine signifikante Reduktion der Bax-Proteinexpression unter *Bid-Silencing*, könnte somit die DBTC/siRNA^{Bid}-Vorbehandlung ebenfalls Auswirkungen auf die hepatische Nekrose haben und diese reduzieren.

Deshalb lässt die Tatsache, dass mitochondriale Translokationen von tBid und Bax eng miteinander verbunden sind und ähnliche Auswirkungen auf den molekularen Pathomechanismus der Nekrose haben (Irrinki et al., 2011; Karch et al., 2013; Karch und Molkentin, 2015), vermuten, dass die Nekrose und nicht die Apoptose den führenden Zelltodmechanismus unter APAP-Intoxikation darstellt. Da bei *Bax-silenced* Mäusen die Leberschädigung aber 12 h nach Medikamentengabe trotzdem eintrat, ist in dieser Arbeit offen, inwieweit eine anhaltende Reduktion der Leberschäden erreicht werden kann. Hierzu sind weitere Studien nötig. Weiterhin zeigte sich unter *Bid-Silencing* eine signifikante Reduzierung der nekrotischen Gewebefläche und der HMGB1-Konzentration, welche ebenfalls ein Marker für sterile Inflammation ist. Obwohl AST und ALT unter DBTC/siRNA^{Bid} Applikation keine signifikante Reduktion anzeigten, kann trotzdem von einem deutlichen Rückgang des hepatischen Parenchymschadens ausgegangen werden, da HMGB1 als Marker der Nekrose deutlich sensitiver als ALT und AST ist (Antoine et al., 2012).

Somit deuten die Ergebnisse unter *Bid-Silencing* darauf hin, dass eine regulierte Nekrose der vorherrschende Zelltodmechanismus sein könnte. Diese Vermutung wird durch viele andere Studien bestätigt, die eine Form der regulierten Nekrose beim APAP-induzierten ALV beobachteten (Gujral, 2002; Jaeschke und Lemasters, 2003; Bajt, 2004; Kon et al., 2004; Ramachandran und Jaeschke, 2018). Auch unter der regulierten Nekrose sind Inflammationsreaktionen beschrieben (Ramachandran und Jaeschke, 2018; Jaeschke et al., 2012a; 2012b). So konnte die sterile Entzündung unter *Bid-Silencing*, gemessen durch signifikant erniedrigte HMGB1-Konzentrationen, reduziert werden. Es scheint sowohl bei der angeborenen Immunantwort, der sterilen Entzündung als auch bei der Regeneration von geschädigtem Gewebe beteiligt zu sein (Woolbright und Jaeschke, 2015; Jaeschke et al., 2012b). Kontrovers diskutiert wird, ob die Mitwirkung bei der Entzündung oder der regenerative Aspekt stärkere Auswirkungen auf das ALV haben (Woolbright und Jaeschke, 2015; Jaeschke et al., 2012b). Welche Rolle nun die dominierende von HMGB1 ist, bleibt zum jetzigen Stand der Forschung offen. Trotz signifikant reduzierter HMGB1 Konzentrationen unter APAP-induzierter siRNA^{Bid}-Exposition kann daraus nicht

grundsätzlich geschlussfolgert werden, dass die sterile Entzündungsreaktion oder die dadurch aktivierten Regenerationsmechanismen unter Bid-*Silencing* abgenommen haben, da neben HMGB1 und DNA-Fragmenten viele weitere DAMPs existieren, die ebenfalls zu einer sterilen Inflamationsreaktion beitragen können (Ramachandran und Jaeschke, 2018; Bianchi, 2009; Woolbright und Jaeschke, 2017).

Allerdings konnte im Rahmen der Inflamationsreaktion unter APAP-Intoxikation und Bid-*Silencing* keine Abnahme der hepatischen Leukozyteninteraktionen beobachtet werden. Da aber Jaeschke et al. 2012 trotz nachweisbarer proinflammatorischer Mediatoren und Entzündungszellen keine direkte Zytotoxizität bei APAP-induziertem ALV feststellen konnten, könnte das Ausbleiben der Reduktion der Inflammation durch Bid-*Silencing* nur eine untergeordnete Rolle bei der Protektion vor einem APAP-induzierten Leberschaden spielen. Diese Inflammation scheint also nicht der Hauptverursacher des APAP-induzierten ALV zu sein (James et al., 2003; Williams et al., 2010a; Jaeschke et al., 2012a; Ramachandran und Jaeschke, 2018). Außerdem existieren neben Bid weitere Proteine und Mechanismen, die eine Rekrutierung von Immunzellen bewirken und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion verstärken können (Badmann et al., 2011; 2012; Jaeschke et al., 2012a).

Leukozyteninteraktionen können aber aufgrund der Größe und Architektur der Lebersinusoide zu einer Vasokonstriktion, Ödembildung sowie einem langsamen Blutfluss und letztendlich zu einem Perfusionsversagen führen (Ito et al., 2003). Obwohl zum Auswertungszeitpunkt in dieser Arbeit zwar keine signifikante Leukozytenreduktion beobachtet werden konnte, war das Perfusionsversagen unter Bid-*Silencing* weniger stark ausgeprägt, was vermuten lässt, dass nicht unbedingt nur die Inflamationsreaktion zum Perfusionsversagen führt, sondern eher der nekrotische Leberschaden per se, welcher wiederum vor allem zu sterilen Entzündungsprozessen führt. Inwieweit auch da Leukozyteninfiltration, dann ggf. zeitlich versetzt zum tragen kommen, bleibt zu vermuten. Vielleicht wäre daher auch eine verminderte Leukozyteninteraktion zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt detektierbar gewesen. DBTC/siRNA^{Bid}-Applikation konnte aber die Perfusion nicht auf Normalwerte bringen. Aufgrund der weiteren Ergebnisse, wie der massiven Reduzierung der DNA-fragmentierten Hepatozyten und der nekrotischen Areale, kann aber geschlussfolgert werden, dass eine Vorbehandlung mit DBTC/siRNA^{Bid} vor APAP-induziertem Leberversagen schützt.

Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchung der *Off-Target* Effekte bekräftigt. Um diese Effekte, die besonders durch die siRNA-Gabe entstehen können, auszuschließen, wurde die Konzentration von GSH und die mRNA-Expression von *cyp2e1* bestimmt. Es zeigte sich, dass die Exposition mit APAP zu einem Verbrauch von *Off-targets* führte, was durch eine konsequente Reduktion der *cyp2e1* mRNA-Expression angezeigt wurde. Da durch den Wirkmechanismus von APAP im Rahmen der Biotransformation der Leber

APAP zu einem bestimmten Anteil über CYP2E1 abgebaut wird (Rumack, 2002), erklärt dies die reduzierte *cyp2e1* mRNA-Expression unter APAP-Exposition. Ein potentieller *Off-target* Effekt durch die siRNA-Gabe ist somit eher unwahrscheinlich.

Die hepatischen GSH-Konzentrationen blieben in den PBS- wie interessanterweise auch in den APAP-Gruppen unter den Vorbehandlungen stabil. Obwohl APAP ebenfalls im Rahmen der Biotransformation GSH verbraucht, zeigten die Ergebnisse keine Reduktion der GSH-Konzentrationen unter APAP-Gabe. Fraglich bleibt, ob die GSH-Konzentrationen bereits so erniedrigt waren, dass sich der toxische APAP Metabolit NAPQI vorwiegend an mitochondriale Proteine gebunden hat oder andere Mechanismen zu einer stabilen GSH-Konzentration in allen Versuchsgruppen führten. Womöglich war auch insbesondere nur der mitochondriale GSH-Speicher entleert, wobei in dieser Arbeit aber nur die gesamte hepatische GSH-Konzentration bestimmt wurde. Potentielle *Off-target* Effekte waren aber auch bei den GSH-Konzentrationen unwahrscheinlich, da alle GSH-Konzentrationen nahezu identisch blieben. Eine endgültige Bewertung, inwieweit APAP oder siRNAs eine Reduktion der *Off-Target* Effekte bewirkten, kann jedoch nicht abschließend vorgenommen werden, da nur eine Untersuchung zum finalen Zeitpunkt durchgeführt wurde.

Dennoch ist aufgrund der *bid*-mRNA-Analyse sowie der Bid-Proteinanalyse davon auszugehen, dass nicht *Off-target* Effekte, sondern eine Reduktion der *bid*-mRNA- und Bid-Protein-Expression hauptsächlich für den Schutz unter APAP-verursachtem ALV verantwortlich war und spezifisch zu sein scheint. Dies bekräftigt die Hypothese, dass Bid als therapeutisches Target im Zusammenspiel mit siRNA-basierter Technik in Zukunft bei APAP-Intoxikation eingesetzt werden könnte. Allerdings sollte es in Kombination mit anderen Therapieansätzen angewandt werden, da weiterhin mikrozirkulatorische Defizite und insbesondere nicht-sterile Inflamationsreaktionen unter APAP-Exposition und Bid-*Silencing* auftreten. Zudem sollte die Verabreichung zeitgleich bzw. gebunden an die APAP-Gabe erfolgen, so dass auch ein therapeutischer Effekt erzielt werden kann.

8.4 ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend zeigte sich zunächst, dass transientes leberspezifisches *Targeting* der Bid-Expression mittels liposomaler siRNA-Verabreichung erfolgreich ist und hepatoprotektive Effekte hat. Bezüglich des Zelltodmechanismus beim APAP-induzierten ALV ist eine abschließende Aussage nicht sicher möglich. Bei fehlender cleaved Caspase 3 Expression ist ein reiner apoptotischer Zelltod bei APAP-induziertem ALV unwahrscheinlich. Ein Übergang von apoptotischen zu nekrotischen Zelluntergängen ist nicht ausgeschlossen, da aufgrund von ATP Mangel einige Studien bereits einen Übergang zeigen konnten (Vollmar und Menger, 2009). Die Merkmale einer klassischen Nekrose sind ebenfalls nicht erfüllt, so zeigen sich bspw. Zellen mit DNA-Fragmentierung. In dieser Arbeit wird aufgrund der Ergebnisse und der vorherigen Studien (Jaeschke et al., 2019; Jaeschke und Ramachandran, 2020; Shojaie et al., 2020) davon ausgegangen, dass die regulierte Nekrose der dominierende Zelltodmechanismus beim APAP-induzierten ALV ist. Weiterhin muss davon ausgegangen werden, dass die Vorbehandlung mit DBTC/siRNA^{Bid} nur zu einer partiellen Reduktion des unter APAP-verursachten Leberschadens beiträgt, da sie das Perfusionsdefizit nur leicht und die leukozytären Interaktionen nicht signifikant reduzieren konnte und somit als alleiniger therapeutischer Ansatz nicht ausreichend ist. Die sterile Inflammation konnte unter Bid-*Silencing* durch signifikant erniedrigte HMGB1 Konzentrationen, welche auch einen Marker der Nekrose darstellen, reduziert werden, allerdings wird HMGB1 in der Literatur auch eine regenerative Eigenschaft beim APAP-induzierten ALV zugeschrieben (Woolbright und Jaeschke, 2015; Jaeschke et al., 2012b), sodass die Rolle von HMGB1 in dieser Arbeit nicht abschließend bewertet werden kann. Ein direkter Therapieansatz konnte nicht aufgezeigt werden, da die Vorbehandlung mit siRNA^{Bid} bereits 48 h vor APAP-Gabe erfolgte und damit im klinischen Alltag eine Umsetzung dessen nicht möglich ist. Allerdings wurde die aktuelle Literatur durch eine organspezifische siRNA-Gabe *in vivo* beim APAP-induzierten ALV insbesondere bezüglich des Pathomechanismus von APAP bestätigt und erweitert, indem hepatoprotektive Effekte, auch im Bereich des nekrotischen Zelltodes erzielt werden konnten. Weitere Studien, zu späteren Zeitpunkten und in direktem zeitlichen Zusammenhang mit der APAP-Einnahme, sollen zeigen, inwieweit leberspezifisches Bid-*Silencing* länger anhaltende therapeutische Effekte erzielen kann.

9. THESEN ZUR DISSERTATION

1. Das APAP-induzierte ALV ist ein schwerwiegendes Krankheitsbild, das ohne adäquate Therapie mit hoher Letalität assoziiert ist.
2. Diese präklinische Studie im Mausmodell unter APAP-Gabe zeigt typische Merkmale eines ALV wie erhöhte Transaminasenwerte, Perfusionsdefizite und verstärkte Leukozyteninteraktionen.
3. Das ALV unter APAP-Gabe zeigt apoptotische ebenso wie nekrotische Merkmale.
4. Eine fehlende gespaltene Caspase 3 Expression bei signifikant erhöhten HMGB1 Konzentrationen und deutlich nekrotischen Arealen, in Verbindung mit neuesten Erkenntnissen aus anderen Studien, spricht für das Vorliegen einer regulierten Nekrose beim durch APAP-induzierten ALV.
5. Es kann eine siRNA gegen nahezu jede zelluläre RNA entwickelt werden. SiRNAs haben dadurch ein großes therapeutisches Potential.
6. Durch die organspezifische DBTC-Applikation können Nebenwirkungen der systemischen Wirkweise der siRNAs reduziert werden und es wird eine hohe leberspezifische Wirksamkeit erreicht.
7. Die systemische Applikation einer leberspezifischen DBTC/siRNA^{Bid} führt zu einer reduzierten *bid* mRNA-Expression und einer verminderten Bid-Proteinexpression.
8. Die Applikation von DBTC/siRNA^{Bid} kann das Perfusionsdefizit nur leicht sowie die Leukozyteninteraktionen nicht signifikant verringern.
9. Die Applikation von DBTC/siRNA^{Bid} führt zu einer starken Abnahme der Zellen mit DNA-Fragmentierung sowie der nekrotischen Areale.
10. *Off-target* Effekte können durch die Bestimmung von der *cyp2e1* mRNA-Expression und der GSH-Konzentration zum Zeitpunkt + 6 h ausgeschlossen werden, da keine wesentlichen Unterschiede in den verschiedenen Gruppen bestehen.

10. LITERATURVERZEICHNIS

- Abourbih, D. A., Gosselin, S., Villeneuve, E. & Kazim, S. (2016). Are Recommended Doses of Acetaminophen Effective for Children Aged 2 to 3 Years? A Pharmacokinetic Modeling Answer. *Pediatric Emergency Care*, 32(1), 6–8. <https://doi.org/10.1097/pec.0000000000000665>
- Abshagen, K., Brensel, M., Genz, B., Roth, K., Thomas, M., Fehring, V., Schaeper, U. & Vollmar, B. (2015). Foxf1 siRNA Delivery to Hepatic Stellate Cells by DBTC Lipoplex Formulations Ameliorates Fibrosis in Livers of Bile Duct Ligated Mice. *Current Gene Therapy*, 15(3), 215–227. <https://doi.org/10.2174/1566523215666150126114634>
- Adams, M. L., Pierce, R. H., Vail, M. E., White, C. C., Tonge, R. P., Kavanagh, T. J., Fausto, N., Nelson, S. D. & Bruschi, S. A. (2001). Enhanced Acetaminophen Hepatotoxicity in Transgenic Mice Overexpressing BCL-2. *Molecular Pharmacology*, 60(5), 907–915. <https://doi.org/10.1124/mol.60.5.907>
- Antoine, D. J., Williams, D. P., Kipar, A., Jenkins, R. E., Regan, S. L., Sathish, J. G., Kitteringham, N. R. & Park, B. K. (2009). High-Mobility Group Box-1 Protein and Keratin-18, Circulating Serum Proteins Informative of Acetaminophen-Induced Necrosis and Apoptosis In Vivo. *Toxicological Sciences*, 112(2), 521–531. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp235>
- Antoine, D. J., Jenkins, R. E., Dear, J. W., Williams, D. P., McGill, M. R., Sharpe, M. R., Craig, D. G., Simpson, K. J., Jaeschke, H. & Park, B. K. (2012). Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*, 56(5), 1070–1079. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.019>
- Arras, M., Autenried, P., Rettich, A., Spaeni, D., & Rüllicke, T. (2001). Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine*, 51(5), 443–456.
- Badmann, A., Keough, A., Kaufmann, T., Bouillet, P., Brunner, T. & Corazza, N. (2011). Role of TRAIL and the pro-apoptotic Bcl-2 homolog Bim in acetaminophen-induced liver damage. *Cell Death & Disease*, 2(6), e171. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.55>
- Badmann, A., Langsch, S., Keogh, A., Brunner, T., Kaufmann, T. & Corazza, N. (2012). TRAIL enhances paracetamol-induced liver sinusoidal endothelial cell death in a Bim- and Bid-dependent manner. *Cell Death & Disease*, 3(12), e447. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.185>
- Bajt, M. L. (2004). Acetaminophen-Induced Oxidant Stress and Cell Injury in Cultured Mouse Hepatocytes: Protection by N-Acetyl Cysteine. *Toxicological Sciences*, 80(2), 343–349. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh151>

- Bajt, M. L., Cover, C., Lemasters, J. J. & Jaeschke, H. (2006). Nuclear Translocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor during Acetaminophen-Induced Liver Cell Injury. *Toxicological Sciences*, 94(1), 217–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl077>
- Bajt, M. L., Farhood, A., Lemasters, J. J. & Jaeschke, H. (2008). Mitochondrial Bax Translocation Accelerates DNA Fragmentation and Cell Necrosis in a Murine Model of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(1), 8–14. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129445>
- Barshes, N. R., Gay, A. N., Williams, B., Patel, A. J. & Awad, S. S. (2005). Support for the Acutely Failing Liver: A Comprehensive Review of Historic and Contemporary Strategies. *Journal of the American College of Surgeons*, 201(3), 458–476. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2005.04.007>
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- Bernal, W. & Wendon, J. (2013). Acute Liver Failure. *New England Journal of Medicine*, 369(26), 2525–2534. <https://doi.org/10.1056/nejmra1208937>
- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R. & Leone, S. (2006). Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *CNS Drug Reviews*, 12(3–4), 250–275. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x>
- Bianchi, M. E. (2009). HMGB1 loves company. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(3), 573–576. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008585>
- Black, M. (1980). Acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology*, 78(2), 382–392. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(80\)90593-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(80)90593-4)
- Brok, J., Buckley, N. & Gluud, C. (2006). Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003328.pub2>
- Burcham, P. C. & Harman, A. W. (1991). Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), 5049–5054. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)67754-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)67754-9)
- Bustin, S. & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109(4), 365–379. <https://doi.org/10.1042/cs20050086>
- Canbay, A., Jochum, C., Bechmann, L., Festag, S., Gieseler, R., Yüksel, Z., Lütkes, P., Saner, F., Paul, A. & Gerken, G. (2009). Acute Liver Failure in a Metropolitan Area in Germany: a Retrospective Study (2002 – 2008). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 47(09), 807–813. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1109058>

- Canbay, A., Tacke, F., Hadem, J., Trautwein, C., Gerken, G. & Manns, M. P. (2011). Acute Liver Failure. *Deutsches Aerzteblatt Online*, 714–434. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0714>
- Cartron, P. F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F. M. & Juin, P. (2004). The First α Helix of Bax Plays a Necessary Role in Its Ligand-Induced Activation by the BH3-Only Proteins Bid and PUMA. *Molecular Cell*, 16(5), 807–818. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.028>
- Christofferson, D. E. & Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.003>
- Chun, L. J., Tong, M. J., Busuttil, R. W. & Hiatt, J. R. (2009). Acetaminophen Hepatotoxicity and Acute Liver Failure. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(4), 342–349. <https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e31818a3854>
- Cohen, S. D. & Khairallah, E. A. (1997). Selective Protein Arylation and Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 29(1–2), 59–77. <https://doi.org/10.3109/03602539709037573>
- Cover, C., Mansouri, A., Knight, T. R., Bajt, M. L., Lemasters, J. J., Pessayre, D. & Jaeschke, H. (2005). Peroxynitrite-Induced Mitochondrial and Endonuclease-Mediated Nuclear DNA Damage in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 879–887. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.088898>
- Crimi, E., Sica, V., Williams-Ignarro, S., Zhang, H., Slutsky, A. S., Ignarro, L. J. & Napoli, C. (2006). The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(3), 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.054>
- Czauderna, F. (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 31(11), 2705–2716. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg393>
- Dapas, B., Farra, R., Grassi, M., Giansante, C., Fiotti, N., Uxa, L., Rainaldi, G., Mercatanti, A., Colombatti, A., Spessotto, P., Lacovich, V., Guarnieri, G. & Grassi, G. (2009). Role of E2F1-Cyclin E1-Cyclin E2 Circuit in Human Coronary Smooth Muscle Cell Proliferation and Therapeutic Potential of Its Downregulation by siRNAs. *Molecular Medicine*, 15(9–10), 297–306. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00030>
- Dara, L., Johnson, H., Suda, J., Win, S., Gaarde, W., Han, D. & Kaplowitz, N. (2015). Receptor interacting protein kinase 1 mediates murine acetaminophen toxicity independent of the necrosome and not through necroptosis. *Hepatology*, 62(6), 1847–1857. <https://doi.org/10.1002/hep.27939>
- Davidson, D. G. & Eastham, W. N. (1966). Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *BMJ*, 2(5512), 497–499. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5512.497>

- DeLeve, L. D., McCuskey, R. S., Wang, X., Hu, L., McCuskey, M. K., Epstein, R. B. & Kanel, G. C. (1999). Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology*, 29(6), 1779–1791. <https://doi.org/10.1002/hep.510290615>
- Demetriou, A. A., Brown, R. S., Busuttil, R. W., Fair, J., McGuire, B. M., Rosenthal, P., Am Esch, J. S., Lerut, J., Nyberg, S. L., Salizzoni, M., Fagan, E. A., de Hemptinne, B., Broelsch, C. E., Muraca, M., Salmeron, J. M., Rabkin, J. M., Metselaar, H. J., Pratt, D., De La Mata, M., . . . Solomon, B. A. (2004). Prospective, Randomized, Multicenter, Controlled Trial of a Bioartificial Liver in Treating Acute Liver Failure. *Annals of Surgery*, 239(5), 660–670. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000124298.74199.e5>
- Dixon, S., Lemberg, K., Lamprecht, M., Skouta, R., Zaitsev, E., Gleason, C., Patel, D., Bauer, A., Cantley, A., Yang, W., Morrison, B. & Stockwell, B. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Eipel, C., Kidess, E., Abshagen, K., LeMinh, K., Menger, M. D., Burkhardt, H. & Vollmar, B. (2007). Antileukoprotease protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *British Journal of Pharmacology*, 151(3), 406–413. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707230>
- El-Hassan, H., Anwar, K., Macanas-Pirard, P., Crabtree, M., Chow, S. C., Johnson, V. L., Lee, P. C., Hinton, R. H., Price, S. C. & Kass, G. E. (2003). Involvement of mitochondria in acetaminophen-induced apoptosis and hepatic injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(2), 118–129. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00240-0](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00240-0)
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Farra, R., Pozzato, G., Dapas, B., Agostini, E., Scaggiante, B., Guarnieri, G., Colombo, M. & Grassi, G. (2006). 251 A sirna targeted against srf reduces hepatocellular carcinoma cell proliferation, showing its potential use in the growth inhibition of this type of tumour. *Journal of Hepatology*, 44, S100. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(06\)80252-7](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(06)80252-7)
- Felderhoff-Müser, U. (2004). Die Bedeutung apoptotischer Signaltransduktionsmechanismen in klinischen und experimentellen Schädigungsmodellen des unreifen Gehirns. Dissertation
- Ferret, P. (2001). Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology*, 33(5), 1173–1180. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.24267>
- Fontana, R. J. (2008). Acute Liver Failure Including Acetaminophen Overdose. *Medical Clinics of North America*, 92(4), 761–794. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.03.005>

- Giladi, H., Ketzinell-Gilad, M., Rivkin, L., Felig, Y., Nussbaum, O. & Galun, E. (2003). Small interfering RNA Inhibits Hepatitis B virus replication in mice. *Molecular Therapy*, 8(5), 769–776. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(03\)00244-2](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(03)00244-2)
- Grassi, M., Cavallaro, G., Scire, S., Scaggiante, B., Dapas, B., Farra, R., Baiz, D., Giansante, C., Guarnieri, G., Perin, D. & Grassi, G. (2010). Current Strategies to Improve the Efficacy and the Delivery of Nucleic Acid Based Drugs. *Current Signal Transduction Therapy*, 5(2), 92–120. <https://doi.org/10.2174/157436210791112163>
- Gressner, A. M. & Arndt, T. (2019). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik (Springer Reference Medizin) (3., neu bearb. und erw. Aufl. 2019 Aufl.)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4>
- Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13(15), 1899–1911. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1899>
- Guha, M., Maity, P., Choubey, V., Mitra, K., Reiter, R. J. & Bandyopadhyay, U. (2007). Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. *Journal of Pineal Research*, 43(4), 372–381. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2007.00488.x>
- Gujral, J. S. (2002). Mode of Cell Death after Acetaminophen Overdose in Mice: Apoptosis or Oncotic Necrosis? *Toxicological Sciences*, 67(2), 322–328. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.2.322>
- Hadem, J., Stiefel, P., Bahr, M. J., Tillmann, H. L., Rifai, K., Klempnauer, J., Wedemeyer, H., Manns, M. P. & Schneider, A. S. (2008). Prognostic Implications of Lactate, Bilirubin, and Etiology in German Patients With Acute Liver Failure. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 6(3), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.12.039>
- Harrison, P., Keays, R., Bray, G., Alexander, G. & Williams, R. (1990). Improved outcome of paracetamol-induced fulminant hepatic failure by late administration of acetylcysteine. *The Lancet*, 335(8705), 1572–1573. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91388-q](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91388-q)
- Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J. R., Farrell, G., Kaminsky, L. S., Spivack, S. D., Boitier, E. & Beaune, P. (1999). Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*, 20(1–2), 1–137. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(99)00005-9)
- Hikita, H., Takehara, T., Kodama, T., Shimizu, S., Shigekawa, M., Hosui, A., Miyagi, T., Tatsumi, T., Ishida, H., Li, W., Kanto, T., Hiramatsu, N., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. & Hayashi, N. (2011). Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis

- upon fas activation in bak/bax-deficient mice. *Hepatology*, 54(1), 240–251. <https://doi.org/10.1002/hep.24305>
- Hu, J., Ramshesh, V. K., McGill, M. R., Jaeschke, H. & Lemasters, J. J. (2015). Low Dose Acetaminophen Induces Reversible Mitochondrial Dysfunction Associated with Transient c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Mouse Liver. *Toxicological Sciences*, 150(1), 204–215. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv319>
- Huang, Y., Hong, J., Zheng, S., Ding, Y., Guo, S., Zhang, H., Zhang, X., Du, Q. & Liang, Z. (2011). Elimination Pathways of Systemically Delivered siRNA. *Molecular Therapy*, 19(2), 381–385. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.266>
- Huang, W., Liang, Y., Sang, C., Mei, C., Li, X. & Chen, T. (2018). Therapeutic nanosystems co-deliver anticancer drugs and oncogene SiRNA to achieve synergetic precise cancer chemo-gene therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(19), 3013–3022. <https://doi.org/10.1039/c8tb00004b>
- Irrinki, K. M., Mallilankaraman, K., Thapa, R. J., Chandramoorthy, H. C., Smith, F. J., Jog, N. R., Gandhirajan, R. K., Kelsen, S. G., Houser, S. R., May, M. J., Balachandran, S. & Madesh, M. (2011). Requirement of FADD, NEMO, and BAX/BAK for Aberrant Mitochondrial Function in Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Necrosis. *Molecular and Cellular Biology*, 31(18), 3745–3758. <https://doi.org/10.1128/mcb.05303-11>
- Ito, Y., Bethea, N. W., Abril, E. R. & McCuskey, R. S. (2003). Early Hepatic Microvascular Injury in Response to Acetaminophen Toxicity. *Microcirculation*, 10(5), 391–400. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800204>
- Jaeschke, H. (1990). Oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity: Protection by allopurinol. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 14. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90218-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90218-8)
- Jaeschke, H. (2002). Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65(2), 166–176. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>
- Jaeschke, H. (2015). Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Digestive Diseases*, 33(4), 464–471. <https://doi.org/10.1159/000374090>
- Jaeschke, H., Adelusi, O. B. & Ramachandran, A. (2021). Ferroptosis and Acetaminophen Hepatotoxicity – Are We Going Down Another Rabbit Hole? *Gene Expression*, 1–25. <https://doi.org/10.3727/105221621x16104581979144>
- Jaeschke, H. & Bajt, M. L. (2006). Intracellular Signaling Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Cell Death. *Toxicological Sciences*, 89(1), 31–41. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi336>
- Jaeschke, H., Cover, C. & Bajt, M. L. (2006). Role of caspases in acetaminophen-induced liver injury. *Life Sciences*, 78(15), 1670–1676. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.003>

- Jaeschke, H. & Lemasters, J. J. (2003). Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 125(4), 1246–1257. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)01209-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)01209-5)
- Jaeschke, H., McGill, M. R. & Ramachandran, A. (2012a). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 44(1), 88–106. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.602688>
- Jaeschke, H., McGill, M. R., Williams, C. D. & Ramachandran, A. (2011a). Current issues with acetaminophen hepatotoxicity—A clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Sciences*, 88(17–18), 737–745. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.01.025>
- Jaeschke, H., Ramachandran, A., Chao, X. & Ding, W. X. (2019). Emerging and established modes of cell death during acetaminophen-induced liver injury. *Archives of Toxicology*, 93(12), 3491–3502. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02597-1>
- Jaeschke, H. & Ramachandran, A. (2020). Mechanisms and pathophysiological significance of sterile inflammation during acetaminophen hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111240>
- Jaeschke, H., Ramachandran, A., Chao, X. & Ding, W. X. (2019). Emerging and established modes of cell death during acetaminophen-induced liver injury. *Archives of Toxicology*, 93(12), 3491–3502. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02597-1>
- Jaeschke, H., Williams, C. D. & Farhood, A. (2011b). No evidence for caspase-dependent apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, 53(2), 718–719. <https://doi.org/10.1002/hep.23940>
- Jaeschke, H., Williams, C. D., McGill, M. R., Xie, Y. & Ramachandran, A. (2013). Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.063>
- Jaeschke, H., Williams, C. D., Ramachandran, A. & Bajt, M. L. (2012b). Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver International*, 32(1), 8–20. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02501.x>
- James, L. P., McCullough, S. S., Knight, T. R., Jaeschke, H. & Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen Toxicity in Mice Lacking NADPH Oxidase Activity: Role of Peroxynitrite Formation and Mitochondrial Oxidant Stress. *Free Radical Research*, 37(12), 1289–1297. <https://doi.org/10.1080/10715760310001617776>
- Janssen, G. H., Tangelder, G. J., Oude Egbrink, M. G. & Reneman, R. S. (1994). Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and

- anesthetized animals. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 267(3), H1199–H1204. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.3.h1199>
- Jiang, N., Zhang, X., Zheng, X., Chen, D., Siu, K., Wang, H., Ichim, T. E., Quan, D., McAlister, V., Chen, G. & Min, W. P. (2012). A Novel In Vivo siRNA Delivery System Specifically Targeting Liver Cells for Protection of ConA-Induced Fulminant Hepatitis. *PLoS ONE*, 7(9), e44138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044138>
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M. & Miao, E. A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nature Reviews Immunology*, 17(3), 151–164. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.147>
- Karch, J., Kwong, J. Q., Burr, A. R., Sargent, M. A., Elrod, J. W., Peixoto, P. M., Martinez-Caballero, S., Osinska, H., Cheng, E. H. Y., Robbins, J., Kinnally, K. W. & Molkentin, J. D. (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *eLife*, 2, 27–29. <https://doi.org/10.7554/elife.00772>
- Karch, J. & Molkentin, J. D. (2015). Regulated Necrotic Cell Death. *Circulation Research*, 116(11), 1800–1809. <https://doi.org/10.1161/circresaha.116.305421>
- Kawahara, H. (1994). Role of apoptosis in alcoholic liver injury. *Hepatology*, 19(4), 181. [https://doi.org/10.1016/0270-9139\(94\)90491-x](https://doi.org/10.1016/0270-9139(94)90491-x)
- Keays, R., Harrison, P. M., Wendon, J. A., Forbes, A., Gove, C., Alexander, G. J. & Williams, R. (1991). Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial. *BMJ*, 303(6809), 1026–1029. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6809.1026>
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. C., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. D. & Cheng, E. H. Y. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology*, 8(12), 1348–1358. <https://doi.org/10.1038/ncb1499>
- Koch, D. G., Speiser, J. L., Durkalski, V., Fontana, R. J., Davern, T., McGuire, B., Stravitz, R. T., Larson, A. M., Liou, I., Fix, O., Schilsky, M. L., McCashland, T., Hay, J. E., Murray, N., Shaikh, O. S., Ganger, D., Zaman, A., Han, S. B., Chung, R. T., . . . Reuben, A. (2017). The Natural History of Severe Acute Liver Injury. *American Journal of Gastroenterology*, 112(9), 1389–1396. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.98>
- Kon, K., Ikejima, K., Okumura, K., Aoyama, T., Arai, K., Takei, Y., Lemasters, J. J. & Sato, N. (2007). Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(s1), S49–S52. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04962.x>

- Kon, K., Kim, J. S., Jaeschke, H. & Lemasters, J. J. (2004). Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology*, 40(5), 1170–1179. <https://doi.org/10.1002/hep.20437>
- Kozer, E. & Koren, G. (2001). Management of Paracetamol Overdose. *Drug Safety*, 24(7), 503–512. <https://doi.org/10.2165/00002018-200124070-00003>
- Kubes, P. & Mehal, W. Z. (2012). Sterile Inflammation in the Liver. *Gastroenterology*, 143(5), 1158–1172. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.008>
- Kuchmiy, A. A., Efimov, G. A. & Nedospasov, S. A. (2012). Methods for in vivo molecular imaging. *Biochemistry (Moscow)*, 77(12), 1339–1353. <https://doi.org/10.1134/s0006297912120012>
- Kuhla, A., Thrum, M., Schaeper, U., Fehring, V., Schulze-Topphoff, U., Abshagen, K. & Vollmar, B. (2015). Liver-specific Fas silencing prevents galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. *Apoptosis*, 20(4), 500–511. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1088-2>
- Kulkarni, J. A., Cullis, P. R. & van der Meel, R. (2018). Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Therapeutics*, 28(3), 146–157. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0721>
- Lancaster, E. M., Hiatt, J. R. & Zarrinpar, A. (2015). Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Archives of Toxicology*, 89(2), 193–199. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1432-2>
- Larson, A. M. (2007). Acetaminophen Hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*, 11(3), 525–548. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.06.006>
- Larson, A. M., Polson, J., Fontana, R. J., Davern, T. J., Lalani, E., Hynan, L. S., Reisch, J. S., Schiødt, F. V., Ostapowicz, G., Shakil, A. O. & Lee, W. M. (2005). Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, 42(6), 1364–1372. <https://doi.org/10.1002/hep.20948>
- Laskin, D. L. (2009). Macrophages and Inflammatory Mediators in Chemical Toxicity: A Battle of Forces. *Chemical Research in Toxicology*, 22(8), 1376–1385. <https://doi.org/10.1021/tx900086v>
- Lawson, J. A., Fisher, M. A., Simmons, C. A., Farhood, A. & Jaeschke, H. (1999). Inhibition of Fas Receptor (CD95)-Induced Hepatic Caspase Activation and Apoptosis by Acetaminophen in Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156(3), 179–186. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8635>
- Le Minh, K., Klemm, K., Abshagen, K., Eipel, C., Menger, M. D. & Vollmar, B. (2007). Attenuation of Inflammation and Apoptosis by Pre- and Posttreatment of Darbepoetin- α in Acute Liver Failure of Mice. *The American Journal of Pathology*, 170(6), 1954–1963. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061056>

- Lee, S. S., Buters, J. T., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P. & Gonzalez, F. J. (1996). Role of CYP2E1 in the Hepatotoxicity of Acetaminophen. *Journal of Biological Chemistry*, 271(20), 12063–12067. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.20.12063>
- Lee, W. M. (1995). The selling of acetaminophen. *Gastroenterology*, 109(6), 2043–2044. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90778-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90778-5)
- Lee, W. M. (2004). Acetaminophen and the U.S. acute liver failure study group: Lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology*, 40(1), 6–9. <https://doi.org/10.1002/hep.20293>
- Lee, W. M., Squires, R. H., Nyberg, S. L., Doo, E. & Hoofnagle, J. H. (2008). Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology*, 47(4), 1401–1415. <https://doi.org/10.1002/hep.22177>
- Lehr, H. A., Vollmar, B., Vajkoczy, P. & Menger, M. D. (1999). Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells. *Methods in Enzymology*, 462–481. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)00151-2)
- Lei, P., Bai, T. & Sun, Y. (2019). Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review. *Frontiers in Physiology*, 10, 10–139. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00139>
- Lemasters, J. J. (1999). V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276(1), G1–G6. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.1.g1>
- Li, Y., Bhuiyan, M., Mohammad, R. M. & Sarkar, F. H. (1998). Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA. *Oncogene*, 17(22), 2915–2920. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202218>
- Liu, Z. X. & Kaplowitz, N. (2006). Role of innate immunity in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(4), 493–503. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.4.493>
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell*, 94(4), 481–490. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81589-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81589-5)
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. S. & Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nature Cell Biology*, 2(10), 754–756. <https://doi.org/10.1038/35036395>
- Malhi, H., Gores, G. J. & Lemasters, J. J. (2006). Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Hepatology*, 43(S1), S31–S44. <https://doi.org/10.1002/hep.21062>
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, 146(1), 3–15. PMID: 7856735

- Makin, A. J., & Williams, R. (1997). Acetaminophen-induced hepatotoxicity: predisposing factors and treatments. *Advances in internal medicine*, 42, 453–483.
- McCaffrey, A. P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F. H., Xu, H., Wieland, S. F., Marion, P. L. & Kay, M. A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nature Biotechnology*, 21(6), 639–644. <https://doi.org/10.1038/nbt824>
- McGill, M. R., Lebofsky, M., Norris, H. R. K., Slawson, M. H., Bajt, M. L., Xie, Y., Williams, C. D., Wilkins, D. G., Rollins, D. E. & Jaeschke, H. (2013). Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: Dose–response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269(3), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.03.026>
- McGill, M. R. & Jaeschke, H. (2013). Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharmaceutical Research*, 30(9), 2174–2187. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1007-6>
- Mempel, T. R., Scimone, M. L., Mora, J. R. & von Andrian, U. H. (2004). In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Current Opinion in Immunology*, 16(4), 406–417. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.05.018>
- Menger, M., Marzi, I. & Messmer, K. (1991). In vivo Fluorescence Microscopy for Quantitative Analysis of the Hepatic Microcirculation in Hamsters and Rats. *European Surgical Research*, 23(3–4), 158–169. <https://doi.org/10.1159/000129148>
- Meyers, L. L., Beierschmitt, W. P., Khairallah, E. A. & Cohen, S. D. (1988). Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 93(3), 378–387. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(88\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(88)90040-3)
- Mohar, I., Stamper, B. D., Rademacher, P. M., White, C. C., Nelson, S. D. & Kavanagh, T. J. (2014). Acetaminophen-induced liver damage in mice is associated with gender-specific adduction of peroxiredoxin-6. *Redox Biology*, 2, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.008>
- Naoumov, N. V. (2014). Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology*, 61(5), 1166–1174. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.008>
- Natori, S., Rust, C., Stadheim, L. M., Srinivasan, A., Burgart, L. J. & Gores, G. J. (2001). Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 34(2), 248–253. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)00089-1](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)00089-1)
- Nelson, S. (1990). Molecular Mechanisms of the Hepatotoxicity Caused by Acetaminophen. *Seminars in Liver Disease*, 10(04), 267–278. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040482>
- Nigro, P., Pompilio, G. & Capogrossi, M. C. (2013). Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death & Disease*, 4(10), e888. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.410>

- Nikam, R. R. & Gore, K. R. (2018). Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery. *Nucleic Acid Therapeutics*, 28(4), 209–224. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0715>
- Paxian, M., Bauer, I., Rensing, H., Jaeschke, H., Mautes, A. E. M., Kolb, S. A., Wolf, B., Stockhausen, A., Jeblick, S. & Bauer, M. (2003). Recovery of hepatocellular ATP and “pericentral apoptosis” after hemorrhage and resuscitation. *The FASEB Journal*, 17(9), 993–1002. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0624com>
- Pittet, M. & Weissleder, R. (2011). Intravital Imaging. *Cell*, 147(5), 983–991. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.004>
- Polson, J. & Lee, W. M. (2005). AASLD position paper: The management of acute liver failure. *Hepatology*, 41(5), 1179–1197. <https://doi.org/10.1002/hep.20703>
- Prescott, L. F. (1981). Treatment of Severe Acetaminophen Poisoning With Intravenous Acetylcysteine. *Archives of Internal Medicine*, 141(3), 386. <https://doi.org/10.1001/archinte.1981.00340030118021>
- Prescott, L. F., Illingworth, R. N., Critchley, J. A., Stewart, M. J., Adam, R. D. & Proudfoot, A. T. (1979). Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *BMJ*, 2(6198), 1097–1100. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.6198.1097>
- Ramachandran, A. & Jaeschke, H. (2017). Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *Journal of Clinical and Translational Research*, 157. <https://doi.org/10.18053/jctres.03.2017s1.002>
- Ramachandran, A. & Jaeschke, H. (2018). Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expression*, 18(1), 19–30. <https://doi.org/10.3727/105221617x15084371374138>
- Ramachandran, P. V. & Ignacimuthu, S. (2013). RNA Interference—A Silent but an Efficient Therapeutic Tool. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(6), 1774–1789. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0098-1>
- Ramaiah, S. K. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1551–1557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.007>
- Raucci, A., Palumbo, R. & Bianchi, M. E. (2007). HMGB1: A signal of necrosis. *Autoimmunity*, 40(4), 285–289. <https://doi.org/10.1080/08916930701356978>
- Ray, S. D. & Jena, N. (2000). A hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X L , and BCL-X S during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells in vivo. *Archives of Toxicology*, 73(10–11), 594–606. <https://doi.org/10.1007/s002040050013>
- Reid, A. B., Kurten, R. C., McCullough, S. S., Brock, R. W. & Hinson, J. A. (2005). Mechanisms of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Role of Oxidative Stress and

- Mitochondrial Permeability Transition in Freshly Isolated Mouse Hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 509–516. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.075945>
- Reuben, A., Koch, D. G. & Lee, W. M. (2010). Drug-induced acute liver failure: Results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology*, 52(6), 2065–2076. <https://doi.org/10.1002/hep.23937>
- Rolfe, D. F. & Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews*, 77(3), 731–758. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>
- Rumack, B. H. (2002). Acetaminophen Hepatotoxicity: The First 35 Years. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 40(1), 3–20. <https://doi.org/10.1081/clt-120002882>
- Rutter, K., Horvatits, T., Drolz, A., Roedl, K., Siedler, S., Kluge, S. & Fuhrmann, V. (2018). Akutes Leberversagen. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 113(3), 174–183. <https://doi.org/10.1007/s00063-016-0156-x>
- Rutter, K., Horvatits, T., Drolz, A., Roedl, K., Siedler, S., Kluge, S. & Fuhrmann, V. (2019). Akutes Leberversagen. *Wiener klinisches Magazin*, 22(1), 38–47. <https://doi.org/10.1007/s00740-018-0243-0>
- Saetzler, R., Jallo, J., Lehr, H., Philips, C., Vasthare, U., Arfors, K. & Tuma, R. (1997). Intravital Fluorescence Microscopy: Impact of Light-induced Phototoxicity on Adhesion of Fluorescently Labeled Leukocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(4), 505–513. <https://doi.org/10.1177/002215549704500403>
- Salgia, A. D. T. & Kosnik, S. D. (1999). When acetaminophen use becomes toxic. *Postgraduate Medicine*, 105(4), 81–90. <https://doi.org/10.3810/pgm.1999.04.673>
- Santel, A., Aleku, M., Keil, O., Endruschat, J., Esche, V., Durieux, B., Löffler, K., Fechtner, M., Röhl, T., Fisch, G., Dames, S., Arnold, W., Giese, K., Klippel, A. & Kaufmann, J. (2006). RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Therapy*, 13(18), 1360–1370. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302778>
- Sasaki, C., Kitagawa, H., Zhang, W. R., Warita, H., Sakai, K. & Abe, K. (2000). Temporal profile of cytochrome c and caspase-3 immunoreactivities and TUNEL staining after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurological Research*, 22(2), 223–228. <https://doi.org/10.1080/01616412.2000.11741065>
- Scaggiante, B., Dapas, B., Farra, R., Grassi, M., Pozzato, G., Giansante, C. & Grassi, G. (2011). Improving siRNA Bio-Distribution and Minimizing Side Effects. *Current Drug Metabolism*, 12(1), 11–23. <https://doi.org/10.2174/138920011794520017>
- Schmidt, L. E. (2005). Age and paracetamol self-poisoning. *Gut*, 54(5), 686–690. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.054619>

- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A. & Korsmeyer, S. J. (2002). A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. *Developmental Cell*, 2(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00116-2)
- Setten, R. L., Rossi, J. J. & Han, S. P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(6), 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
- Shojaie, L., Iorga, A. & Dara, L. (2020). Cell Death in Liver Diseases: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9682. <https://doi.org/10.3390/ijms21249682>
- Smilkstein, M. J., Knapp, G. L., Kulig, K. W. & Rumack, B. H. (1988). Efficacy of Oral N-Acetylcysteine in the Treatment of Acetaminophen Overdose. *New England Journal of Medicine*, 319(24), 1557–1562. <https://doi.org/10.1056/nejm198812153192401>
- Soriano, M. & Scorrano, L. (2011). Traveling Back and Forth from Mitochondria to Control Apoptosis. *Cell*, 145(1), 15–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.025>
- Springer, A. D. & Dowdy, S. F. (2018). GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics*, 28(3), 109–118. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>
- Spronk, P. E., Zandstra, D. F. & Ince, C. (2004). Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation. *Critical Care*, 8(6), 462. <https://doi.org/10.1186/cc2894>
- Steinbauer, M., Harris, A. G., Abels, C. & Messmer, K. (2000). Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 385(4), 290–298. <https://doi.org/10.1007/s004239900108>
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267(5203), 1445–1449. <https://doi.org/10.1126/science.7878463>
- Tanaka, M., Tanaka, K., Masaki, Y., Miyazaki, M., Kato, M., Kotoh, K., Enjoji, M., Nakamuta, M., & Takayanagi, R. (2014). Intrahepatic microcirculatory disorder, parenchymal hypoxia and NOX4 upregulation result in zonal differences in hepatocyte apoptosis following lipopolysaccharide- and D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(2), 254–262. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1573>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P. & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Thiel, K., Klingert, W., Klingert, K., Morgalla, M. H., Schuhmann, M. U., Leckie, P., Sharifi, Y., Davies, N. A., Jalan, R., Peter, A., Grasshoff, C., Königsrainer, A., Schenk, M. &

- Thiel, C. (2017). Porcine model characterizing various parameters assessing the outcome after acetaminophen intoxication induced acute liver failure. *World Journal of Gastroenterology*, 23(9), 1576. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i9.1576>
- Tirmenstein, M. A. & Nelson, S. D. (1989). Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9814–9819. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)81731-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)81731-8)
- Tydén, E., Tjälve, H. & Larsson, P. (2014). Gene and protein expression and cellular localisation of cytochrome P450 enzymes of the 1A, 2A, 2C, 2D and 2E subfamilies in equine intestine and liver. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0069-8>
- Underhill, T. J., Greene, M. K. & Dove, A. F. (1990). A comparison of the efficacy of gastric lavage, ipecacuanha and activated charcoal in the emergency management of paracetamol overdose. *Emergency Medicine Journal*, 7(3), 148–154. <https://doi.org/10.1136/emj.7.3.148>
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 700–714. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W. & Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *Journal of Experimental Medicine*, 187(9), 1477–1485. <https://doi.org/10.1084/jem.187.9.1477>
- Vollmar, B. & Menger, M. D. (1998). The use of intravital microscopy in surgical research. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 383(3–4), 282–285. <https://doi.org/10.1007/s004230050133>
- Vollmar, B. & Menger, M. D. (2009). The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. *Physiological Reviews*, 89(4), 1269–1339. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2008>
- Vollmar, B., Richter, S. & Menger, M. D. (1996). Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 270(5), G798–G803. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.5.g798>
- Walker, R. M., Racz, W. J. & McElligott, T. F. (1985). Acetaminophen-Induced hepatotoxic congestion in mice. *Hepatology*, 5(2), 233–240. <https://doi.org/10.1002/hep.1840050213>
- Walter, J., Burdelski, M. & Bröring, D. C. (2008). Chances and Risks in Living Donor Liver Transplantation. *Deutsches Aerzteblatt Online*, 101–107. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0101>

- Wei, M. C. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, 292(5517), 727–730. <https://doi.org/10.1126/science.1059108>
- Whelan, R. S., Konstantinidis, K., Wei, A. C., Chen, Y., Reyna, D. E., Jha, S., Yang, Y., Calvert, J. W., Lindsten, T., Thompson, C. B., Crow, M. T., Gavathiotis, E., Dorn, G. W., O'Rourke, B. & Kitsis, R. N. (2012). Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6566–6571. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201608109>
- Williams, C. D., Bajt, M. L., Farhood, A. & Jaeschke, H. (2010a). Acetaminophen-induced hepatic neutrophil accumulation and inflammatory liver injury in CD18-deficient mice. *Liver International*, 30(9), 1280–1292. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02284.x>
- Williams, C. D., Farhood, A. & Jaeschke, H. (2010b). Role of caspase-1 and interleukin-1 β in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247(3), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.004>
- Willis, S. N. & Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.10.001>
- Wittebole, X. & Hantson, P. (2011). Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARSTM) for the management of acute poisoning with or without liver failure. *Clinical Toxicology*, 49(9), 782–793. <https://doi.org/10.3109/15563650.2011.624102>
- Woolbright, B. L. & Jaeschke, H. (2015). Therapeutic targets for cholestatic liver injury. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(4), 463–475. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1103735>
- Woolbright, B. L. & Jaeschke, H. (2017). Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *Journal of Hepatology*, 66(4), 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.017>
- Yan, H. M., Ramachandran, A., Bajt, M. L., Lemasters, J. J. & Jaeschke, H. (2010). The Oxygen Tension Modulates Acetaminophen-Induced Mitochondrial Oxidant Stress and Cell Injury in Cultured Hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 117(2), 515–523. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq208>
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A. & Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400(6747), 886–891. <https://doi.org/10.1038/23730>
- Yoon, J. H. & Gores, G. J. (2002). Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *Journal of Hepatology*, 37(3), 400–410. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(02\)00209-x](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00209-x)

- Zhang, C., Feng, J., Du, J., Zhuo, Z., Yang, S., Zhang, W., Wang, W., Zhang, S., Iwakura, Y., Meng, G., Fu, Y. X., Hou, B. & Tang, H. (2017). Macrophage-derived IL-1 α promotes sterile inflammation in a mouse model of acetaminophen hepatotoxicity. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(11), 973–982. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.22>
- Zimmermann, H. W., Trautwein, C. & Tacke, F. (2012). Functional Role of Monocytes and Macrophages for the Inflammatory Response in Acute Liver Injury. *Frontiers in Physiology*, 3, 56. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00056>
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C. & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 92(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(01\)00159-0](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(01)00159-0)

11. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotion bei Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, der Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock, bedanken. Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, insbesondere Berit Blendow, Dorothea Frenz, Maren Nerowski und dem anderen medizinisch-technischen Personal, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem gilt mein Dank Silence Therapeutics GmbH, insbesondere Ute Schaeper und Sibylle Dames, für das zur Verfügung stellen der siRNA, der leberspezifischen Komponente und das in mich gesetzte Vertrauen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau apl. Prof. Dr. rer. nat. Angela Kuhla bedanken. Ohne ihre Unterstützung und Hilfe wäre diese Dissertation, wie ebenfalls das veröffentlichte Paper nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die tolle Betreuung!

Als letztes möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ohne meine Freunde und ihre Unterstützung, aufmunternden und konstruktiven Gespräche wäre diese Dissertation vermutlich immernoch nicht fertig. Bei meinen Großeltern möchte ich mich dafür bedanken, dass ihr immer für mich da seid und wart. Ihr habt mich und meine Wünsche immer unterstützt und mich bestärkt. Bei meiner Mutter möchte ich mich für den fachlichen Rat und die aufmunternden Worte, wenn wieder mal ein Experiment nicht geklappt hatte, bei meinem Mann für die tolle Unterstützung über die letzten Jahre bedanken. Ebenso gilt mein Dank meinen Söhnen Finian (für seine kreativen Ideen, um Mama möglichst lange von der Dissertation abzuhalten) und Frederik (der durch sein „verfrühtes Licht der Welt erblicken“ meinen Zeitplan ebenfalls wieder durcheinanderbrachte). Ich bin glücklich so tolle Freunde und eine so wunderbare Familie zu haben, ohne euch alle würde ich heute nicht diese Zeilen schreiben.

12. PUBLIKATION

Peer-review Originalarbeit:

Maxa, M., Schaeper, U., Dames, S., Vollmar, B. & Kuhla, A. (2019). Liver-specific Bid silencing inhibits APAP-induced cell death in mice. *Apoptosis*, 24(11–12), 934–945.
<https://doi.org/10.1007/s10495-019-01571>