

Aus den Laboratorien der Medizinischen Forschung
der Firma Roche Diagnostics ehemals Boehringer Mannheim GmbH

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Histopathologische, immunhistologische
und biochemische Untersuchungen
zur Prüfung der Wirksamkeit von Imexon im GalN/LPS-Modell
der Maus unter besonderer Berücksichtigung der Milz**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Nadja Schiemenz

Gießen 2002

Aus den Laboratorien der Medizinischen Forschung
der Firma Roche Diagnostics ehemals Boehringer Mannheim GmbH
Betreuer: Prof. Dr. Franz Hartig

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Ilse Käufer-Weiß

**Histopathologische, immunhistologische
und biochemische Untersuchungen
zur Prüfung der Wirksamkeit von Imexon im GalN/LPS-Modell
der Maus unter besonderer Berücksichtigung der Milz**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Nadja Schiemenz
Tierärztin aus Ladenburg

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Hartig
2. Berichterstatterin:	Prof. Dr. I. Käufer-Weiß
Tag der mündlichen Prüfung:	21.05.2002

Meinen Eltern und meinem Mann

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Imexon	3
2.1.1	Entwicklung und potentielle Anwendungsgebiete	3
2.1.2	Wirkungsmechanismen und Angriffspunkte der Imexonwirkung	4
2.2	Sepsis und septischer Schock	5
2.2.1	Definition	5
2.2.2	Epidemiologie	6
2.2.3	Klinik und Pathologie	6
2.2.4	Pathogenese	7
2.2.5	Alternative Therapien	7
2.3	Das Galaktosamin/LPS-Hepatitis-Modell	8
2.3.1	Entwicklung und Bedeutung des Modells	8
2.3.2	Pathologische Veränderungen im GalN/LPS-Hepatitis-Modell	9
2.3.3	Pathogenese	11
2.4	Dexamethason	16
2.5	Monoklonale Antikörper zur immunhistologischen Darstellung von Zellen des Abwehrsystems bei der Maus	18
2.5.1	Lymphozyten-Marker	18
2.5.2	Makrophagen-Marker	21
3	Material und Methoden	25
3.1	Versuchstiere	25
3.2	Versuchssubstanzen	25
3.2.1	Lipopolysaccharide (LPS)	25
3.2.2	Galaktosamin (GalN)	25
3.2.3	Imexon	26
3.2.4	Dexamethason	26

3.3	Antikörper für die immunhistologische Färbung und den TUNEL-Test	27
3.3.1	Monoklonale Antikörper	27
3.3.2	Polyklonale Antikörper	27
3.3.3	Sekundärantikörper und ABC-Komplex	28
3.3.4	TUNEL-Test	28
3.3.5	Antikörper zur FACS-Analyse	28
3.4	Versuchsanordnung	29
3.4.1	Anzahl der Versuchstiere und Gruppeneinteilung	29
3.4.2	Applikation der Prüfsubstanzen	31
3.4.3	Applikation von GalN/LPS	31
3.4.4	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	31
3.5	Versuchsdurchführung	31
3.5.1	Haltungsbedingungen der Tiere	31
3.5.2	Applikation der Substanzen	32
3.5.3	Blutentnahme und Serumgewinnung	32
3.5.4	Sektion der Tiere und Fixierung des Materials	32
3.6	Untersuchungsmethoden	33
3.6.1	Klinische Untersuchung vor und während des Versuches	33
3.6.2	Serologische Untersuchungen	33
3.6.2.1	Bestimmung des TNF α -Serumspiegels	33
3.6.2.2	Bestimmung des Spiegels der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und der Alanin-Aminotransferase (ALAT) im Plasma	34
3.6.3	Zytofluometrische Untersuchung	35
3.6.3.1	Vorbereitung des Blutes zur zytofluometrischen Untersuchung	35
3.6.3.2	Vorbereitung der Milz zur zytofluometrischen Untersuchung	35
3.6.3.3	FACS-Analyse	36
3.6.4	Pathologisch-anatomische Untersuchungen	36

3.6.5	Pathologisch-histologische Untersuchungen	36
3.6.5.1	Pathologisch-histologische Untersuchungen am Paraffinschnitt	36
3.6.5.1.1	Vorbereitung des Gewebes	36
3.6.5.1.2	Färbung	37
3.6.5.2	Pathologisch-histologische Untersuchungen am Kryostatschnitt	37
3.6.5.2.1	Vorbereitung des Gewebes	37
3.6.5.2.2	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	38
3.6.5.2.3	Immunhistologische Färbung der Milz	38
3.6.5.2.4	Immunhistologische Färbung der Leber	39
3.6.5.2.5	TUNEL-Test	40
3.6.6	Auswertung	40
3.6.7	Morphometrie	42
3.6.8	Statistik	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Klinische Befunde	43
4.2	Mortalität	43
4.3	Serologische Befunde	45
4.3.1	TNF α -Serumspiegel	45
4.3.2	ASAT-Plasmaspiegel	47
4.3.3	ALAT-Plasmaspiegel	49
4.4	FACS-Analyse des peripheren Blutes	51
4.4.1	Lymphozyten im peripheren Blut	51
4.4.1.1	Gesamtlymphozyten	51
4.4.1.2	B- und T- Lymphozyten (B 220, CD3)	53
4.4.2	Monozyten	55
4.5	Milzgewichte	56
4.6	Gesamtzellzahlen der Milz	56
4.7	FACS-Analyse der Milz	57
4.8	Pathologisch-anatomische Befunde der Leber	61

4.9	Pathologisch-histologische Befunde der Leber	61
4.9.1	Kontrollgruppen	61
4.9.2	Vergleichsgruppen für die isolierte Applikation von GalN bzw. LPS	61
4.9.3	Therapiegruppen	62
4.9.3.1	7h-Gruppen	62
4.9.3.2	24h-Gruppen	63
4.10	Immunhistologische Befunde der Leber	69
4.10.1	Makrophagen in der Leber	69
4.10.1.1	Kontrollgruppen	69
4.10.1.2	Therapiegruppen	69
4.10.2	Makrophagen und Granulozyten in der Leber	70
4.10.2.1	Kontrollgruppen	70
4.10.2.2	Therapiegruppen	71
4.11	TUNEL-Test in der Leber	79
4.11.1	Kontrollgruppen	79
4.11.2	Therapiegruppen	79
4.11.2.1	7h-Gruppen	79
4.11.2.2	24h-Gruppen	79
4.12	Pathologisch-anatomische Befunde der Milz	80
4.13	Pathologisch-histologische Befunde in der Milz	80
4.13.1	Kontrollgruppen	80
4.13.2	Vergleichsgruppen für die isolierte Applikation von GalN bzw. LPS	80
4.13.3	Therapiegruppen	81
4.13.3.1	7h-Gruppen	81
4.13.3.2	24h-Gruppen	82
4.14	Immunhistologische Befunde der Milz	82
4.14.1	T-Lymphozyten in der Milz	82
4.14.1.1	T-Gesamt-Zellpopulation	82
4.14.1.2	T-Helferzellen	84
4.14.1.3	Zytotoxische und T-Suppressorzellen	86
4.14.1.4	Subpopulation der zytotoxischen und T-Suppressorzellen	88

4.14.2	B-Lymphozyten in der Milz	92
4.14.2.1	Kontrollgruppen	92
4.14.2.2	Therapiegruppen	93
4.14.3	Makrophagen in der Milz	97
4.14.3.1	Marginalmetallophile Makrophagen	97
4.14.3.2	Marginalzonenmakrophagen	98
4.14.3.3	Makrophagen der roten Pulpa	106
4.14.3.4	Gewebsmakrophagen der roten und weißen Pulpa	107
4.14.3.5	Gewebsmakrophagen und Granulozyten	109
4.15	Morphometrie	110
5	Diskussion	113
5.1	Letalität	113
5.2	Klinik	113
5.3	Leber	114
5.3.1	Histopathologie	114
5.3.1	Immunhistologie	116
5.3.1.1	Apoptotisch veränderte Zellen	116
5.3.1.2	Granulozyten (MAC-1)	117
5.3.1.3	Makrophagen (MAC-1, F4/80)	120
5.3.2	Transaminasen	122
5.4	TNF α	123
5.5	FACS-Analyse des Blutes	125
5.5.1	Leukozyten	125
5.5.2	B- und T-Lymphozyten (B220, CD3)	127
5.6	Milz	127
5.6.1	Milzgewichte/ FACS-Analyse der Milz	128
5.6.2	Histopathologie/Immunhistologie	129
5.6.2.1	Pathologisch-histologische Veränderungen im GalN/LPS-Modell nach sieben Stunden	129
5.6.2.1.1	Rote Pulpa	129
5.6.2.1.2	Marginalzone	133
5.6.2.1.3	Follikel	138
5.6.2.1.4	PALS	142

5.6.2.2	Pathologisch-histologische Veränderungen im GalN/LPS-Modell nach vierundzwanzig Stunden	148
5.6.2.2.1	Rote Pulpa	148
5.6.2.2.2	Marginalzone	152
5.6.2.2.3	Follikel	156
5.6.2.2.4	PALS	158
5.7	Abschließende Betrachtung	160
6.	Zusammenfassung	165
7	Summary	167
8	Literaturverzeichnis	169
9	Anhang	199

Abkürzungen

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl 2-Antagonist
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Bcl 2 (Bcl x)	Apoptose-hemmendes Onkogen
BSA	Bovines Serumalbumin
C3b, C3bi	Komplementabbauprodukte
CD...	Cluster Determinante ... (bezeichnet Oberflächenantigene, die Zellpopulationen charakterisieren)
CR	Komplementrezeptor
DAB	3,3'Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DMDP	Dichloromethylene diphosphonate
DNA	Desoxyribonuclein acid
DTH	Delayed-Type-Hypersensitivity
EGF	Epidermal growth factor
F	Follikel
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FAS	Apoptose-vermittelnder Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie
FASL	FAS-Ligand
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GalN	Galaktosamin

GM-CSF	Granulocyte-macrophages colony stimulating factor
H.E.	Hämatoxylin Eosin
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
ICAM	Intercellular adhesions molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LTD ₄	Leuktrien D ₄
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major histocompatibility complex
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MZ	Marginalzone
m RNA	messenger Ribonuklein acid
NFκB	nuclear factor κB (Kappa-Genverstärker-Bindungsprotein)
NK-Zellen	Natural-killer-Zellen
PALS	Periarterielle Lymphozytenscheide
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
RP	Rote Pulpa
PHA	Phythämagglutinin
SDH	Sorbit-Dehydrogenase
SEM	Standard error of the mean
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SPF	spezific pathogen free
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-R	TNF-Rezeptor

1 Einleitung

Imexon ist eine pharmakologisch aktive Substanz mit immunmodulierender Wirkung. Die Substanz beeinflusst vor allem zellvermittelte Abwehrfunktionen. Neben einer Stimulation von Makrophagen und T-Zellen (Bicker und Hebold 1977b, Bonfert et al. 1977) steht hierbei die selektive Hemmung von B-Lymphozyten im Vordergrund (Haag und Herrmann 1989, Scheuer und Russmann 1989).

Ursprünglich wurde die Substanz im Rahmen der Krebsforschung entwickelt. Aufgrund der zunehmenden Kenntnis der Bedeutung immunpathologischer Zusammenhänge für eine Vielzahl von Krankheiten wurde ihre therapeutische Wirkung auch in Modellen für andere Erkrankungen, wie systemischer Lupus erythematodes, systemische mikrobielle Infektionen und AIDS ausgetestet (Bicker 1980, Chirigos et al. 1990, Steger 1993).

Bakterielle Infektionen und Sepsis zeichnen sich trotz einer wachsenden Zahl antimikrobieller Substanzen und trotz intensivmedizinischer Versorgung durch eine hohe Mortalitätsrate aus (Hinshaw et al. 1987, Salomao et al. 1999). Untersuchungen der zugrunde liegenden Pathomechanismen haben gezeigt, dass an der Pathogenese des Krankheitsbildes der Sepsis bzw. des Multi-Organ-Versagens (MODS) komplexe Wechselwirkungen zwischen Bakterien bzw. bakteriellen Produkten und Abwehrmechanismen beteiligt sind (Salomao et al. 1999). Die Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten systemischer bakterieller Infektionen konzentriert sich entsprechend neben der Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe auf die Beeinflussung immunpathologischer Abläufe (Bone et al. 1992, Salomao et al. 1999).

Aufgrund seiner positiven Wirkung auf verschiedene systemische Infektionen im Modell (Ziegler et al. 1977, Bicker 1980) sowie des Wirkmechanismus auf Basis einer Beeinflussung zellvermittelter Abwehrmechanismen ist auch der Immunmodulator Imexon als potentielles Adjuvans bei der Therapie derartiger Erkrankungen von Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu untersuchen, ob Imexon im GalN/LPS-Modell der Maus, das durch die toxischen Eigenschaften bakterieller Endotoxine gekennzeichnet ist, eine therapeutische Wirkung zeigt. Damit stellt die Untersuchung gleichzeitig auch eine Evaluation für einen möglichen humantherapeutischen Einsatz im Rahmen bakterieller Infektionen oder der Sepsis dar. Das im GalN/LPS-Modell primär geschädigte Organ ist die Leber (Galanos et al. 1979, Wendel 1990). An der Aufnahme von LPS und der Vermittlung der toxischen Wirkung ist außerdem v.a. die Milz beteiligt (Freudenberg und Galanos 1990, Shiratori et al. 1990a, Hiraoka et al. 1995). Durch serologische Untersuchungen und die histopathologische Beurteilung dieser Organe soll die Wirksamkeit der Substanz im GalN/LPS-Modell ermittelt werden. Die gezielte Darstellung verschiedener Abwehrzellen mittels immunhistologischer Markierung soll die Mechanismen und Angriffspunkte der Imexonwirkung näher beleuchten.

2 Literaturübersicht

2.1 Imexon

2.1.1 Entwicklung und potentielle Anwendungsgebiete

Imexon, 4-Imino-1,3diazobicyclo-(3.1.0.)-hexan-2-on, ist eine pharmakologisch aktive Substanz mit immunmodulierender Wirkung. Es gehört zur Gruppe der 2-Cyanaziridine und wurde erstmals von Bicker (Bicker 1975a) im Rahmen der Weiterentwicklung der Aziridine, einer Substanzgruppe zytotoxischer Kanzerostatika, synthetisiert.

Mit der Herstellung der 2-Cyanaziridine ist es gelungen die alkylierenden Eigenschaften und die daraus resultierende Toxizität dieser Kanzerostatika zu beseitigen, ohne deren Wirksamkeit zu beeinflussen (Bicker 1975a, 1978a, Bicker und Fuhse 1975).

Nachfolgend wurde mit Hilfe von In-vitro-Untersuchungen und von Versuchsreihen an Ratten und Mäusen in vivo die Antitumorwirkung auf eine Stimulation zellvermittelter Immunvorgänge zurückgeführt (Von Ardenne 1975, Bicker und Hebold 1977a, 1977b, Bicker 1978a, 1978b).

Die therapeutische Wirkung von Imexon wurde in klinischen Phase I- und Phase II-Untersuchungen bei Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen auch für den Menschen bestätigt (Micksche et al. 1978a, 1978c, 1980, 1985). Durch gleichzeitige immunologische Untersuchungen an behandelten Patienten konnte ein immunstimulierender Effekt (Micksche et al. 1977, 1978b, Hillier 1978) bzw. bei anergischen Patienten eine teilweise Wiederherstellung der immunologischen Reaktionsbereitschaft (Micksche et al. 1978a, 1985) nachgewiesen werden.

Im Rahmen von experimentellen Infektionen bei Mäusen bewirkte Imexon bei *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* als infektiösen Agentien eine Immunstimulation und konnte eine durch Hydrokortison ausgelöste Immunsuppression aufheben (Bicker und Hebold 1977a, Ziegler et al. 1977, Bicker 1978b). Azimexon, eine von Imexon abgeleitete pharmakologisch wirksame Substanz aus der Gruppe der 2-Cyanaziridine, schützte Mäuse ebenfalls vor den Folgen einer systematischen *Candida*-Infektion und beeinflusste als Adjuvans in Kombination mit einer subtherapeutischen Dosis Chloramphenicol auch den Verlauf einer Infektion mit *E. coli* positiv (Bicker 1980).

Neuere In-vitro-Untersuchungen an Tumorzelllinien und frischen Tumorzellen ergaben eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber Imexon bei lymphoiden Tumorzellen und Myelomen. Zellen solider Tumoren waren weniger empfindlich (Hersh et al. 1992, Salmon et al. 1993, Dorr et al. 1995). Eine kanzerostatische Wirkung von Imexon konnte auch in vivo bei der Entwicklung von humanen B-Zell-Lymphomen im Modell bei SCID-Mäusen beobachtet werden (Hersh et al. 1993a, 1993c). Außerdem beeinflusste es in vitro und in vivo die Wirkung myelosuppressiver und nicht-myelosuppressiver Kanzerostatika positiv (Hersh et al. 1995).

Als Immunmodulator bzw. -stimulator ist Imexon bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen (Steger 1993) sowie als potentiell Therapeutikum bei der HIV-Infektion von Interesse (Hersh 1991). In verschiedenen AIDS-Modellen bei Mäusen wurde die Entstehung von Lymphadenopathien und Splenomegalie gehemmt bzw. gänzlich aufgehoben, wobei wiederum keine direkte antivirale, sondern eine immunvermittelte Wirkung vorlag (Chirigos et al. 1990, Hersh et al. 1990, Morrey et al. 1990).

Weiterhin dient Imexon als chemische Leitstruktur für die Entwicklung und Charakterisierung anderer 2-Cyanaziridin-Derivate (Franken 1990). Einige dieser Derivate, z.B. Azimexon, weisen eine höhere chemische Stabilität und geringere Nebenwirkungen auf. Sie wurden außer in der Krebstherapie vor allem auch bei rheumatoiden und Autoimmunerkrankungen ausgetestet (Bicker 1975b, Micksche et al. 1985, Bopp 1995).

2.1.2 Wirkungsmechanismen und Angriffspunkte der Imexonwirkung

Bei den frühen Untersuchungen zur allgemeinen kanzerostatischen Wirkung von Imexon wurden in erster Linie Hinweise auf eine Verstärkung zellvermittelter Immunvorgänge mit einer Stimulation von T-Zellen und Makrophagen gefunden (Bicker und Hebold 1977a, Cerni 1977, Micksche et al. 1980).

Spätere In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass B- und T-Zelllinien und Myelom-Zellen eine größere Empfindlichkeit gegenüber Imexon aufweisen, als Tumorzelllinien verschiedener anderer Organe, und auch bei Mitogen-stimulierten Lymphozyten des peripheren Blutes wurde eine Proliferationshemmung nachgewiesen. Bei den betreffenden Zelllinien wurden eine Hemmung der Proteinsynthese und des Zellzyklus sowie das Auftreten von Einzelstrangbruchstellen in der DNA festgestellt (Hersh et al. 1992, 1993b, Dorr et al. 1993). Neuere Untersuchungen identifizieren die Imexon-bedingten Zelluntergänge als Apoptosen, die bei empfänglichen Zellen über eine Bindung der Substanz an zelluläre Thiole durch oxidativen Stress induziert werden (Dvorakova et al. 2000).

Eine Knochenmarksuppression wurde unter dem Einfluss von Imexon nicht beobachtet (Hersh et al. 1993a, 1993c, 1995).

In anderen Versuchen wurde die Wirkung von Imexon auf Lymphozyten mit Hilfe verschiedener Zellproliferations- und -differenzierungs-Tests genauer charakterisiert. Dabei ergab sich eine bevorzugte Hemmung der B-Lymphozytenproliferation sowohl bei transformierten B-Zelllinien als auch bei Mitogen- und Lymphokin-stimulierten B-Lymphozyten (Haag und Herrmann 1989, Scheuer und Rußmann 1989)

Auch in vivo konnte eine Beeinflussung speziell der Lymphozyten durch Imexon dargestellt werden. Bei Untersuchungen zur immunsuppressiven Wirkung von Imexon in Modellen für Autoimmunerkrankungen trat eine B-Zell-selektive Wirkung zutage. B-Zellhyperaktivität, Hyperglobulinämie und die Entwicklung von Autoimmunität konnten verringert werden (Franken 1990). In der Milz wurde eine selektive Reduktion der Zahl der Ig⁺-B-Zellen festgestellt (Hermann et al. 1993, Steger 1993, Steger et al. 1993).

Bei Versuchen, die im Rahmen der AIDS-Forschung an verschiedenen HIV-Modellen bei Mäusen durchgeführt wurden, kam es zu einer zahlenmäßigen Abnahme der B-Lymphozyten in der Milz, die Aktivität der T-Lymphozyten war verstärkt, die der NK-Zellen hingegen unverändert (Sidwell et al. 1990 a, Chirigos et al. 1991, Morrey et al. 1991).

Obwohl u.a. die oben aufgeführten Ergebnisse auf eine B-Zell-selektive Wirkung von Imexon hinweisen, lässt z.B. die Wirkung auf Retrovirusinfektionen bei Mäusestämmen mit Immundefekten im B- und T-Zellsystem weitere Wirkmechanismen vermuten (Morrey et al. 1992).

2.2 Sepsis und septischer Schock

2.2.1 Definition

Für die Beschreibung der Sepsis und damit verbundener Symptomenkomplexe werden eine Vielzahl synonyme Begriffe verwendet. Im Rahmen einer Konsensus Konferenz des Amerikanischen „College of Chest Physicians“ und der Gesellschaft für „Critical Care Medicine“ 1992 wurden zur Vereinheitlichung folgende Definitionen vorgeschlagen: Als Sepsis wird das klinische Bild einer Infektion bezeichnet, die systemische Abwehrreaktionen hervorruft. Geht eine Sepsis mit Organdysfunktionen, gestörter Organdurchblutung bzw. Blutdruckabfall einher, spricht man je nach Schweregrad von schwerer Sepsis bzw. vom septischen Schock (Bone et al. 1992, Salomao et al. 1999). Diesen Begriffen, die nur die Folgeerscheinungen systemischer Infektionen einbeziehen, ist die Bezeichnung SIRS (systemic inflammatory response syndrome)

übergeordnet, die vergleichbare Störungen mit nicht-infektiöser Ursache einschließt. Der Prozess des fortschreitenden Versagens verschiedener voneinander unabhängiger Organe im Verlauf der Sepsis bzw. des SIRS wird als MODS (multiple organ dysfunction syndrome) bezeichnet (Bone et al. 1992).

2.2.2 Epidemiologie

Systemische bakterielle Infektionen, Sepsis und septischer Schock bilden einen Krankheitskomplex, dessen Auftreten in den letzten Jahrzehnten um mehr als das Zehnfache zugenommen hat. Betroffen sind v.a. Patienten in Krankenhäusern, die aufgrund einer anderen Grunderkrankung oder deren Behandlung geschwächt oder immunsupprimiert sind (Hale et al. 1986, Salomao et al. 1999). Die Schwere der Grunderkrankung beeinflusst in starkem Maße die Mortalität. Diese lag unter Berücksichtigung mehrerer Untersuchungen an verschiedenen Kliniken im Durchschnitt bei 37 % bei einer Sepsis und sogar bei 59 % beim septischen Schock (Hale et al. 1986). Als Ursache für die wachsende Zahl an Erkrankungen dieser Art werden veränderte Therapieformen wie Bestrahlung, Chemo- und invasive Therapien, aber auch eine veränderte Altersstruktur der Patienten, die Möglichkeit der Behandlung sehr schwer erkrankter Menschen und Hospitalismus angesehen (Hale et al. 1986, Bone et al. 1992, Salomao et al. 1999). Gleichzeitig mit dem Anstieg der Inzidenz wurde auch ein Wechsel im Keimspektrum von Gram-positiven zu Gram-negativen Keimen dokumentiert. In den letzten Jahren hat allerdings auch die Zahl der septischen Infektionen mit Gram-positiven Keimen, v.a. Staphylokokken, und anderen Mikroorganismen wie *Candida* spp. zugenommen (Salomao et al. 1999). Trotz einer wachsenden Zahl antimikrobieller Wirkstoffe und trotz intensivmedizinischer Versorgung ist deshalb die Sepsis bzw. das SIRS ein ernst zu nehmendes Problem und eine häufige Todesursache in Kliniken und Intensivstationen (Hinshaw et al. 1987, Bohlinger et al. 1996).

2.2.3 Klinik und Pathologie

Das Krankheitsbild des septischen Schocks zeigt einen akuten bis perakuten Verlauf. Die Schocksymptomatik kann sich innerhalb von Stunden oder Minuten entwickeln (Hale et al. 1986). Charakteristische Symptome sind Anstieg der Körpertemperatur über 38°C oder Hypothermie, Blutdruckabfall, Tachykardie, Tachypnoe und evtl. Schüttelfrost und Oligurie (Hale et al. 1986, Bone et al. 1992). Im weißen Blutbild zeigt sich zu Beginn häufig eine Leukopenie, die sich im weiteren Verlauf in eine Leukozytose wandelt. Die Blutgase wechseln von einer respiratorischen Alkalose im Initialstadium in eine spätere Hypoxie und metabolische Azidose (Hale et al. 1986).

Aufgrund der Entzündungsvorgänge, hämodynamischer Störungen und der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) kommt es zur Minderdurchblutung verschiedener Organe und zur fortschreitenden Gewebsschädigung. Diese Schädigung findet ihren Ausdruck in dem Symptomenkomplex des Multi-Organ-Versagens (MODS). Betroffen sind in erster Linie Leber, Lunge, Niere, Nebenniere, Milz und seltener der Intestinaltrakt. Die Organe zeigen pathologische Veränderungen wie Stauungserscheinungen, Ödeme, Ablagerung von Fibringerinnseln, Hämorrhagien und Nekrosen (Hartig 1975, Archer 1986).

2.2.4 Pathogenese

An der Entstehung des septischen Schocks bzw. der damit verbundenen hämodynamischen Störungen und Organschäden sind komplexe Wechselwirkungen zwischen den pathogenen Mikroorganismen und den Abwehrmechanismen des Wirtes beteiligt (Salomao et al. 1999). Im Falle der Gram-negativen Infektionen werden für die Induktion der überschießenden systemischen Entzündungsreaktion v.a. bakterielle Endotoxine, sogenannte Lipopolysaccharide (LPS), verantwortlich gemacht (Bohlinger et al. 1996, Salomao et al. 1999). Zwar stimmen Organ- und zelluläre Verteilung von LPS und intakten Bakterien sowie die Zytokinkinetik nach Stimulation mit LPS und mit lebenden Bakterien im Tierversuch nicht völlig überein (Battafarano et al. 1994, Ge et al. 1994, Jotwani et al. 1995), aber LPS verursacht im Modell eine Symptomatik, die dem klinischen Bild der Sepsis im Verlauf bakterieller Infektionen vergleichbar ist (Salomao et al. 1999). Die Wirkung von LPS, aber auch von Exotoxinen Gram-positiver Keime (Gantner et al. 1995) auf den Organismus wird vermittelt durch verschiedene Zytokine, von denen $\text{TNF}\alpha$ eine Schlüsselrolle einnimmt (Beutler et al. 1985, Tracey et al. 1986, Salomao et al. 1999). Z.B. kann mit der Höhe des $\text{TNF}\alpha$ -Blutspiegels eine Prognose bezüglich der Mortalität verknüpft werden (Salomao 1999). Außerdem sind $\text{TNF}\alpha$ und auch IL1 und IL6, die zumindest teilweise $\text{TNF}\alpha$ nachgeschaltet sind (Luster et al. 1994), ursächlich über die Induktion anderer Mediatoren oder zellulärer Wechselwirkungen an der Ausprägung weiterer Veränderungen im septischen Schock wie disseminierter intravasaler Gerinnung, Akut-Phase-Reaktion, hämorrhagisch-nekrotischer Organschäden etc. beteiligt (Tracey et al. 1986, Beutler und Cerami 1988, Baumann und Gauldie 1994, Bohlinger et al. 1996).

2.2.5 Alternative Therapien

Für die erfolgreiche Behandlung einer Sepsis oder eines septischen Schocks ist der Einsatz gezielt gegen das auslösende Agens gerichteter Antibiotika von entscheidender Bedeutung auch im Hinblick auf die Mortalität (Salomao et al. 1999). Neben der Entwicklung neuer Antibiotika mit besserer Resistenzsituation wird aber mit zunehmender Kenntnis der immunpathologischen Mechanismen, die diesen Erkrankungen zugrunde liegen, auch nach Wegen

gesucht, gezielt in diese Abläufe einzugreifen, gerade auch weil durch intensivmedizinische Versorgung den Kreislaufstörungen zwar oft entgegen gewirkt werden kann, nachfolgend aber irreparable Schädigungen lebenswichtiger Organe auftreten (Bohlinger et al. 1996, Salomao et al. 1999). Substanzen, die die immunpathologischen Abläufe während einer Sepsis positiv beeinflussen sollen, müssten daher entweder die überschießende Immunantwort eindämmen und das Fortschreiten der Schädigungen verhindern oder schon der Entstehung einer solchen Reaktion vorbeugen. Als derartige Therapeutika sind u.a. Antikörper gegen LPS und TNF α , Kortikosteroide und Stickstoffmonoxid-Inhibitoren klinisch getestet worden, mit meist zweifelhaften und widersprüchlichen Ergebnissen, die darauf zurückgeführt werden, dass deren Wirkung nicht ausreichend selektiv ist oder nicht zu jedem Zeitpunkt im Verlauf des Multi-Organ-Versagens (MODS) greift. Ziel weiterer Untersuchungen sollte deshalb die Entwicklung immunologisch wirksamer Substanzen sein, die selektiv und steuerbar in die komplexen Abläufe eingreifen, die der Entstehung der Sepsis bzw. des septischen Schocks zugrunde liegen. Durch weiter gehende Erkenntnisse über Mechanismen, den zeitlichen Verlauf sowie jene Faktoren, die Entstehung und Verlauf einer Sepsis beeinflussen, könnten dann gezielt Substanzen zum Einsatz kommen, die dem momentanen Status des Patienten angemessen sind (Bone et al. 1992, Salomao et al. 1999).

2.3 Das Galaktosamin/LPS-Hepatitis-Modell

2.3.1 Entwicklung und Bedeutung des Modells

Die Entstehung einer Hepatitis nach Verabreichung von hohen Dosen des Aminoszuckers Galaktosamin (GalN) wurde zufällig bei Untersuchungen des Glykogenstoffwechsels der Leber entdeckt. Die akuten Leberveränderungen entsprachen in wesentlichen morphologischen Charakteristika denen einer Virushepatitis (Keppler et al. 1968, Reutter et al. 1968). Bei mehrmonatiger Anwendung führt auch GalN zu Fibrose und Zirrhose (Lesch et al. 1970). Die akute, experimentell ausgelöste Erkrankung ist leicht reproduzierbar und im Schweregrad gut zu steuern (El-Mofly et al. 1975). Sie wurde als Modell zur Aufklärung funktioneller Wechselbeziehungen der verschiedenen, an Entzündungen in der Leber beteiligten Zellen und Organe sowie zur Erprobung neuer Behandlungsansätze bei Hepatitis unter dem Namen Galaktosamin-Hepatitis etabliert (Keppler et al. 1968, Decker und Keppler 1972, Wendel 1990).

Bei weiteren Untersuchungen wurde deutlich, dass über die Pfortader aufgenommene bakterielle Endotoxine das Auftreten von pathologischen Leberveränderungen maßgeblich mit beeinflussen (Liehr et al. 1976, Camara et al. 1983). Die Entstehung der Galaktosamin-induzierten Leberveränderungen konnte auf eine extreme Verstärkung der Empfindlichkeit der behandelten Tiere gegenüber diesen Endotoxinen, den Lipopolysacchariden (LPS) zurückgeführt werden (Galanos et al. 1979). Daher wurde das Modell auch verwendet, um

Mechanismen, die der Toxizität von LPS zugrunde liegen, zu erforschen und neue Therapeutika zur Behandlung des septischen Schocks auszutesten (Galanos et al. 1979, Freudenberg und Galanos 1988, Wang und Wendel 1990, Leist et al. 1994).

Die Erscheinungsformen des Zellunterganges im GalN/LPS-Hepatitis-Modell, wie sie bereits zu Anfang bei seiner Etablierung beschrieben wurden (Keppler et al. 1968, Reutter et al. 1968, El-Mofty et al. 1975), zeigen die charakteristischen Merkmale apoptotischer Zelluntergänge (Leist et al. 1995a, Dixon et al. 1997). Vorgänge, die zum Zelltod durch Apoptose führen, sowie die Frage nach den auslösenden Faktoren und der Bedeutung von Apoptose im Rahmen von Immunreaktionen und bei der Tumorentstehung sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung (Dixon et al. 1997). In diesem Zusammenhang gewinnt das GalN/LPS-Modell erneut an Aktualität. Da die Veränderungen v.a. im Anfangsstadium gut steuerbar und reversibel sind, bietet sich der Einsatz als manipulierbares Modell für Apoptose an (El-Mofty et al. 1975, Decker et al. 1995a, Leist et al. 1995a).

Der apoptotische Zelluntergang der Hepatozyten im GalN/LPS-Modell wird durch $\text{TNF}\alpha$ induziert, wenn die Transkription unter dem Einfluss von GalN gehemmt ist (Leist et al. 1994, 1995a, 1995b). $\text{TNF}\alpha$ wird als einer der Hauptmediatoren der letalen Wirkung von GalN/LPS angesehen (Tiegs et al. 1989). Bei der Entdeckung von $\text{TNF}\alpha$ als durch LPS induziertes Zytokin standen anfangs die Auslösung von hämorrhagischen Nekrosen in Tumoren durch $\text{TNF}\alpha$, die Zytotoxizität und seine katabole Stoffwechselwirkung im Blickpunkt (Männel et al. 1980, Old 1985). Mittlerweile gilt seine zentrale Funktion beim bakteriellen Schock als gesichert (Beutler et al. 1985, Beutler und Cerami 1989, Remick et al. 1990). Viele neuere Untersuchungen weisen auf die Beteiligung bei anderen physiologischen, immunologischen und immunpathologischen Vorgängen, wie arthritischen Gelenksveränderungen, Transplantatabstoßungen, Autoimmunerkrankungen und AIDS hin (Dayer et al. 1985, Gordon und Wofsy 1990, Hunt et al. 1992, Holler et al. 1993, Pfeffer et al. 1993, Persidsky et al. 1995, Samson et al. 1995, De Simone et al. 1996, Zhou et al. 1996). Daher ist der Erforschung der Wirkmechanismen und Angriffspunkte von $\text{TNF}\alpha$ sowie der Faktoren, die die $\text{TNF}\alpha$ -Bildung und -Ausschüttung induzieren, bzw. deren medikamentelle Beeinflussung schon seit der Entdeckung dieses Zytokins reges Interesse gewidmet worden. Auch hier kann die GalN/LPS-Hepatitis als Modell dienen (Old 1985, Beutler und Cerami 1989, Leist et al. 1996).

2.3.2 Pathologische Veränderungen im GalN/LPS-Hepatitis-Modell

LPS bzw. GalN/LPS verursacht bereits bei einer einmaligen Gabe im Tierversuch eine schockähnliche Symptomatik mit Beeinträchtigung der Hämodynamik und diverser Stoffwechselfunktionen, Fieber und disseminierter intravasaler Gerinnung (Gilbert 1960, Grün et al. 1976, Morrison 1979). Im GalN/LPS-Modell kommt es aber im Unterschied zum

Endotoxinschock aufgrund des Einsatzes subletaler Dosen LPS an Stelle eines Multi-Organ-Versagens (MODS) primär zur Schädigung der Leber, die durch GalN sensibilisiert worden ist (Galanos et al. 1979, Wendel 1990, Bohlinger et al. 1996). Innerhalb weniger Stunden entsteht eine hochgradige Hepatitis, deren Schweregrad mit dem Anstieg der Sorbitoldehydrogenase und der Serumtransaminasen im Blut korreliert (Galanos et al. 1979, Chojkier und Fierer 1985, Wendel 1990, Leist et al. 1995a).

Im histopathologischen Bild fallen in der Leber neben ausgedehnten, multifokalen Nekrosen und entzündlichen Infiltrationen von Monozyten und Granulozyten ins Gewebe, Granulozyten-sticking in Venolen und Sinusoiden (Schlayer et al. 1989) sowie zahlreiche azidophile Einzelzellnekrosen und Councilman-bodies auf (Reutter et al. 1968, Decker und Keppler 1972, Tiegs und Wendel 1988). Aufgrund typischer histopathologischer Merkmale und des Auftretens charakteristischer DNA-Bruchstücke werden Einzelzellnekrosen und Councilman-bodies in neueren Untersuchungen als apoptotisch veränderte Zellen und Apoptosekörperchen angesprochen (Leist et al. 1995a, Deschl et al. 1999). Leist et al. (1995a) finden Apoptosen im Lebergewebe bereits nach fünf Stunden. Ausgedehntere Zerstörungen der Gewebsstruktur mit Austritt von Erythrozyten ins Gewebe werden erst acht Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS beschrieben. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen werden bereits nach sechs Stunden Ödeme hepatozellulärer Mikrovilli, eine Weitung der sinusoidalen Fenster, Nekrosen von Sinusendothelzellen und der Austritt von roten Blutzellen und Blutplättchen in den Disseschen Raum beschrieben (Takenaka et al. 1998). Lichtmikroskopisch werden neben Zellschrumpfung auch ein Anschwellen von Leberzellen mit fettiger Vakuolisierung (Medline et al. 1970, Leist et al. 1995a, Senaldi et al. 1998) und Glykogenflucht (Keppler et al. 1968, Schiessel et al. 1984) beobachtet. Unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Ausprägung der fettigen Degeneration von Leberzellen werden zurückgeführt auf Unterschiede in der Empfänglichkeit für die toxischen Wirkungen von GalN in Abhängigkeit von Alter und Gewicht der Tiere (Decker und Keppler 1972).

Die schädigende Wirkung von GalN/LPS manifestiert sich nicht ausschließlich in der Leber. Tierartabhängig kommt es v.a. im Magendarmtrakt zu Hämorrhagien und zu disseminierter intravasaler Gerinnung mit Thrombenbildung in verschiedenen Organen (Keppler et al. 1968, Reutter et al. 1968). Decker et al. (1995b) sehen diese Veränderungen als Folge der reduzierten Syntheseleistung der Leber. Beispielsweise sind durch die Leberschädigung die Prothrombinzeit verlängert (Keppler et al. 1968) und die Bildung schützender Akut-Phase-Proteine beeinträchtigt (Schlayer et al. 1988, Alcorn et al. 1992, Libert et al. 1994). Ferner werden auch die Sequestrierung von Granulozyten in der Lunge (Schlayer et al. 1988) und Zellverluste oder Verschiebungen innerhalb von Zellpopulationen der Milz (Deschl 1999) beschrieben. Vergleichbare Zellinfiltrationen und -verschiebungen sind auch bekannt als Reaktion auf

niedrige Dosen von LPS alleine, unabhängig von einer Kombination mit GalN (Haslett et al. 1987, Groenefeld et al. 1988, Remick et al. 1990).

2.3.3 Pathogenese

Galaktosamin wird in erster Linie von Hepatozyten aufgenommen und unter Verbindung mit Uracil-Nukleotiden verstoffwechselt. Dadurch kommt es zu einem selektiven Mangel an Uridylat-Verbindungen in der Leber und nachfolgend zu einer Reduktion der Biosynthese von Nukleinsäuren und Proteinen sowie von Glykoproteinen, Glykolipiden und Glykogen (Decker und Keppler 1972, 1974, Shinozuka et al. 1973). Die Bildung vieler biologisch aktiver Substanzen in der Leber, z.B. von Akut-Phase-Proteinen und Gerinnungsfaktoren, ist beeinträchtigt (Decker und Keppler 1972, 1974, Wang und Wendel 1990, Leist et al. 1995a). Außerdem wird durch die Schädigung der Zellmembran und durch den Anstieg des zytosolischen Kalziumspiegels eine Steigerung der Glykogenolyse hervorgerufen (El-Mofly et al. 1975, Schiessel et al. 1984). Innerhalb der ersten drei bis vier Stunden nach der Verabreichung von GalN sind die morphologischen und funktionellen Veränderungen der Leberzelle reversibel. Sie können mittels Zuführung von Uridin rückgängig gemacht werden (El-Mofly et al. 1975, Schiessel et al. 1984).

Die Störungen im Nukleotidstoffwechsel der Leberzellen alleine konnten allerdings keine befriedigende Erklärung für die auftretenden Zellschädigungen und Entzündungsvorgänge liefern. Daher wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, bei denen deutlich wurde, dass über die Pfortader aus dem Darm aufgenommene bakterielle Endotoxine, die Lipopolysaccharide (LPS), die Entstehung der pathologischen Veränderungen maßgeblich mitbeeinflussen. LPS ist Bestandteil der äußeren Zellmembran von Salmonellen, E. coli und vielen anderen Gram-negativen Bakterien. Es ist u.a. für die Entstehung der Schocksymptomatik im Rahmen von bakteriellen Infektionen verantwortlich (Fox et al. 1990, Raetz et al. 1991). Die Resektion von Dünndarm und Kolon bzw. die Eliminierung der Darmflora verhindern eine Leberschädigung durch GalN (Grün et al. 1976, Camara et al. 1983). Unter dem Einfluss von Galaktosamin kommt es zu einer Verstärkung der Empfindlichkeit gegenüber den toxischen Effekten von LPS, so dass auch normalerweise subtoxische LPS-Konzentrationen zur Entstehung pathologischer Leberveränderungen führen (Galanos et al. 1979, Wendel 1990).

Weitere Untersuchungen zum GalN/LPS-Hepatitis-Modell konzentrieren sich auf die Erforschung der Wirkungsmechanismen eben dieser Lipopolysaccharide sowie der an der Reaktion auf LPS beteiligten Zellen und der Angriffspunkte von LPS. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass LPS nach intravenöser Injektion in zwei Phasen aus dem Blut eliminiert wird. Innerhalb der ersten 15 bis 30 Minuten werden 80 bis 90 % des injizierten LPS vor allem in der Leber, durch Sinusoidalzellen, besonders Kupfferzellen, weniger auch durch Hepatozyten und

in der Milz von Makrophagen sowie von Granulozyten aufgenommen (Mathison und Ulevitch 1979, Freudenberg und Galanos 1990). Das verbleibende LPS wird an HDL gebunden und über Tage hinweg langsam von Granulozyten und Makrophagen in die beiden oben genannten Organe aufgenommen (Freudenberg et al. 1980). Geringe Mengen LPS konnten auch in Lunge, Niere und Nebennierenrinde gefunden werden. Die Ausscheidung von größtenteils noch biologisch aktivem LPS oder Abbauprodukten erfolgt hauptsächlich über Hepatozyten und Galle in die Fäzes (Fox et al. 1990, Freudenberg und Galanos 1990).

Versuche mit histokompatiblen Mäusestämmen von unterschiedlicher LPS-Sensitivität, bei denen ein Transfer von Milz- und Knochenmarkmakrophagen sensibler auf die nicht-sensiblen Tiere durchgeführt wurde, weisen darauf hin, dass diese Zellen ursächlich an der Entfaltung der toxischen Effekte von GalN/LPS beteiligt sind (Chojkier und Fierer 1985, Freudenberg et al. 1986, Shiratori et al. 1995). Dichte und Phagozytoseaktivität der Lebermakrophagen sollen mit für die tierartlich unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber einer Schädigung durch LPS verantwortlich sein (McCuskey et al. 1984). Verstärkung bzw. Hemmung der Aktivität von Makrophagen durch Tumoren, bakterielle Produkte und Chemikalien können die Stärke der Reaktion auf LPS beeinflussen (Grün et al. 1976, Groenefeld et al. 1988, Shiratori et al. 1995).

Endotoxin löst bei Makrophagen die Bildung und Ausschüttung verschiedener Mediatoren und biologisch aktiver Substanzen aus. Die Entdeckung von LPS-Antagonisten und spezifische Untersuchungen zur Zellaktivierung und Signaltransduktion von LPS legten den Schluss nahe, dass es sich hierbei um einen Rezeptor-vermittelten Vorgang handelt. Auf der Suche nach möglichen Rezeptoren wurden verschiedene LPS-bindende Moleküle auf der Zelloberfläche identifiziert (Raetz et al. 1991, Weinstein et al. 1991, Yamakawa et al. 1996). Für B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen der Milz, aber auch für Peritonealmakrophagen, Endothelzellen und Granulozyten wurde ein Rezeptor, der Lipid A binden kann und LPS-Wirkung vermittelt, postuliert (Lei et Morrison 1988a, 1988b, Lei et al. 1991). Für Kupfferzellen wird in vitro die Aufnahme großer Mengen LPS durch einen Mechanismus absorptiver Pinozytose beschrieben (Fox et al. 1990). Hampton et al. (1991) fanden einen unspezifischen „scavenger-Rezeptor“ auf Makrophagen, der LPS ohne Vermittlung der spezifischen Wirkungen bindet, bei dessen Blockierung die schnelle Aufnahme von LPS in die Leber jedoch gehemmt wird. Als weiterer Rezeptor wird CD14, ein Glykoprotein in der Membran von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie und neutrophilen Granulozyten, beschrieben. Durch die Verbindung dieses Rezeptors mit LPS werden die Makrophagen aktiviert und zur Zytokinproduktion angeregt (Wright et al. 1990, Raetz et al. 1991, Arditi et al. 1993, Weinstein et al. 1993). Komplexbildung mit einem speziellen Lipopolysaccharid-Bindungsprotein, dessen Konzentration bei der Akut-Phase-Reaktion deutlich ansteigt, verstärkt und beschleunigt dessen Wirkung (Mathison et al. 1992) bzw. ermöglicht sie im Modell mit GalN-Sensibilisierung erst

(Salomao et al. 1999). Der CD14-Rezeptor hat keine direkte Verbindung zum Zellinneren, die eine Signalübertragung ermöglichen würde. Da aber eine Signaltransduktion nach Rezeptorkontakt stattfindet, wird eine Verbindung des sehr beweglichen Moleküls mit anderen Rezeptoren vermutet, die eine Transduktion möglich machen (Weinstein et al. 1993, Heine et al. 1995, Sanghera et al. 1996). Für neutrophile Granulozyten ist eine solche Verbindung des CD14 mit dem Rezeptor CR3 beschrieben worden, die eine Zelladhäsion an C3b begünstigt und mit Anheftung der Zelle wieder aufgehoben wird (Zarewych et al. 1996). Bei Endothelzellen ermöglicht eine Bindung von löslichem Serum-CD14 an die Zellmembran die Vermittlung der LPS-Wirkung (Arditi et al. 1993). Neben diesem Rezeptor werden v.a. für höhere LPS-Konzentrationen andere vermutet, von denen gleiche biochemische Signale an die Zelle ausgehen (Raetz et al. 1991, Weinstein et al. 1993), die u.a. zur Ausschüttung immunologisch aktiver Stoffe führen.

Wendel et al. (1987) haben LTD₄ als eine der Substanzen identifiziert, die ursächlich an der Entstehung der Gewebsschädigung bei der GalN/LPS-Hepatitis beteiligt ist. Es löst in der Leber eine vorübergehende Ischämie mit nachfolgender Gewebsschädigung durch Sauerstoffradikale aus (Wendel et al. 1987, Tiegs und Wendel 1988).

Unter den Mediatoren, die unter Einwirkung von LPS gebildet und vermehrt ausgeschüttet werden, nimmt aber TNF α eine Schlüsselrolle ein (Tiegs et al. 1989). Durch Injektion einer Kombination von GalN/TNF α kann ebenso wie durch GalN/LPS eine akute Leberentzündung mit hoher Letalität ausgelöst werden. Diese ist morphologisch nicht von der GalN/LPS-induzierten Hepatitis zu unterscheiden (Lehmann et al. 1987, Tiegs et al. 1989, Wendel 1990, Leist et al. 1995a). Eine Vorbehandlung mit TNF α -Antikörpern schützt die Tiere vor der letalen Wirkung von LPS (Beutler et al. 1985, Zuckerman et al. 1991). Nach LPS-Stimulation steigt der TNF α -Spiegel im Serum stark an und erreicht bereits nach ein bis zwei Stunden sein Maximum, um dann innerhalb der nächsten ein bis zwei Stunden wieder unter die Nachweisgrenze abzufallen (Waage 1987, Ulich et al. 1990, Chensue et al. 1991). Eine Hauptquelle für die Produktion von TNF α sind Makrophagen (Männel et al. 1980), aber auch bei aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und verschiedenen anderen Zellpopulationen sind TNF α -Genexpression und -Sekretion beschrieben worden (Beutler und Cerami 1989, Dinarello 1989, Hunt et al. 1992, Gantner et al. 1995). Die Regulierung der TNF α -Ausschüttung erfolgt sowohl auf transkriptionaler Ebene als auch posttranskriptional durch Steuerung der Proteinbildung aus einem vorgebildeten mRNA-Pool (Beutler et al. 1986). Durch Stimulation mit LPS konnte in vitro bei Kupfferzellen die Ausschüttung von TNF α induziert werden (Stachlewitz et al. 1999). Auch in vivo wurde in der Leber nach LPS-Stimulation eine Erhöhung der TNF α -Expression bei Kupfferzellen beobachtet (Chensue et al. 1991). Eine Steigerung der TNF α -mRNA-Bildung nach LPS-Gabe konnte in allen Kupfferzellen, unabhängig von deren Lokalisation nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 1994). Widersprüchliche Angaben über

die TNF α -mRNA-Bildung durch Kupfferzellen in der Literatur sind vermutlich auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der angewandten Methoden zurückzuführen (Ulich et al. 1990, Hoffmann et al. 1994). Außer in der Leber wurde auch in Lunge, Lymphknoten (De Kossodo et al. 1994) und Peritonealmakrophagen sowie in Makrophagen und dendritischen Zellen der Milz (Zuckerman et al. 1991, Bette et al. 1993) eine LPS-abhängige Erhöhung des TNF α -mRNA-Spiegels gefunden, was eine Beteiligung dieser Organe bzw. Zellen an der Bildung und Ausschüttung von TNF α und damit am LPS-induzierten Geschehen vermuten lässt.

Der Wirkungsbereich von TNF α liegt in der Kette der Reaktionsabläufe jenseits des Einflusses LPS-sensitiver Makrophagen. Auch LPS-resistente Mäusestämme entwickeln nach Verabreichung von GalN/TNF α eine akute Hepatitis mit hoher Letalität (Lehmann et al. 1987). TNF α spielt eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation, indem es bei verschiedenen Zellpopulationen die Expression biologisch aktiver Moleküle beeinflusst. Es bewirkt z.B. durch die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM und MAC-1 eine verstärkte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Endothel der Lebersinusoiden (Schlayer et al. 1987, 1988, Essani et al. 1995) und von Monozyten an den Mesangiumzellen der Nierenglomerula (Pai et al. 1996). Auch in der Lunge kann TNF α die Sequestrierung von Granulozyten bewirken (Colletti et al. 1990). Außerdem wird es zu den Apoptose-auslösenden Faktoren gezählt. Der TNF α -induzierten Apoptose kommt bei der Pathogenese im vorliegenden Modell eine besondere Bedeutung zu. TNF α setzt in Leberzellen den Prozess der Apoptose in Gang, wenn diese durch Transkriptionshemmung unter dem Einfluss von GalN sensibilisiert sind. (Leist et al. 1994, 1995a). Allein eine Aktivierung des TNF α -Rezeptors, TNF-R1, bei Hepatozyten ist ausreichend, um bei GalN-sensibilisierten Mäusen Apoptosen und eine Leberschädigung auszulösen (Leist et al. 1995b). Das Auftreten von Apoptosen geht den anderen pathologischen Veränderungen zeitlich voraus, was ihre Bedeutung unterstreicht (Leist et al. 1995a). Leist et al. (1995a) stellen die Hypothese auf, dass durch die Störung im Zellstoffwechsel Hepatozyten nicht nur gegenüber TNF α sensibilisiert werden, sondern dass sie auch durch Apoptose zugrunde gehende Nachbarzellen nicht schnell genug aufnehmen können. Durch das Austreten chemotaktischer Stoffe könnte eine verstärkte Granulozyteninfiltration und schließlich Gewebsnekrose induziert werden (Leist et al. 1995a). Vergleichende Untersuchungen anderer Modelle, bei denen Apoptose bei Hepatozyten z.B. durch FAS-Antikörper induziert wurde, weisen aber darauf hin, dass auch ein direkter Zusammenhang zwischen TNF α und den Entzündungsvorgängen existiert, denn bei FAS-induzierten Apoptosen traten keine vergleichbaren Entzündungsreaktionen auf (Lawson et al. 1998). In Sepsismodellen ohne Sensibilisierung der Leberzellen durch GalN induziert TNF α neben einigen Apoptosen gehäuft Einzelzellnekrosen, d.h. in Abhängigkeit vom Energie-Status der Zielzelle sowie Dauer und Stärke der Exposition kann TNF α bei Leberzellen Apoptose oder Nekrose induzieren (Bohlinger et al. 1996). Im Gegensatz zur

FAS-induzierten Apoptose von Hepatozyten werden für die Induktion von Apoptose durch TNF α bei diesen Zellen zusätzlich begünstigende Faktoren benötigt (Leist et al. 1996).

Sowohl FAS als auch TNF α vermitteln Apoptose über Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Signalweiterleitung erfolgt über einen bei beiden Rezeptoren identischen zytoplasmatischen Abschnitt, der als „death domain“ bezeichnet wird. Über eine Bindung verschiedener weiterer zytoplasmatischer Proteine wird meist eine Aktivierung der Caspase-Kaskade induziert. Diese zytoplasmatischen Proteine sind bei FAS- und TNF α -Rezeptor nicht identisch und entscheiden über den weiteren Verlauf der Apoptose. Nach Aktivierung des TNF-R1-Rezeptors wird in Abhängigkeit der bindenden zytoplasmatischen Proteine zwischen einer direkten und einer indirekten, durch den Austritt mitochondrialer Proteine ins Zytoplasma induzierten Aktivierung der Caspase-Kaskade unterschieden (Nagata 1997). Die Aktivierung der Caspase-Kaskade führt zu einer Vervielfältigung der Apoptosesignale und u.a. über Proteolysevorgänge und Nukleasen zur Entstehung der charakteristischen DNA-Bruchstücke (Nicholson und Thornberry 1997). In Abhängigkeit des Apoptosemechanismus unterliegt der Ablauf dieser Reaktionsfolge an verschiedenen Punkten dem Einfluss hemmender und fördernder Faktoren. Bei Aktivierung des TNF α -Rezeptors kommt es z.B. parallel zur Induktion von Apoptose zu Apoptose-hemmenden Reaktionen: über eine Aktivierung des NF κ B wird die Expression von „Survival“-Faktoren induziert (Nagata 1997). Sensibilisierung von Hepatozyten für TNF α -induzierte Apoptose durch GalN wird u.a. auch auf ein Wegfallen dieser schützenden Faktoren zurückgeführt (Xiong et al. 1999). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Apoptose von Hepatozyten dem hemmenden Einfluss des Bcl-2-Proteins unterliegt (Latta et al. 2000). Das Verhältnis der Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine aus der Gruppe der Bcl-2-Proteine, z.B. das von Bcl-2 zu dessen Gegenspieler Bax, kann ausschlaggebend sein für die Empfänglichkeit einer Zelle für Apoptose (Yamamoto et al. 1998). Die Bcl-2-Proteine sind v.a. in der Membran der Mitochondrien lokalisiert und regulieren hier den Austritt mitochondrialer Proteine (Nagata 1997) im Rahmen der indirekten Aktivierung der Caspase-Kaskade (s.o.). Die Bedeutung der Mitochondrien für die Apoptose von Hepatozyten im vorliegenden Modell wurde auf Basis elektronenmikroskopischer Untersuchungen auch von Angermüller et al. (1998) bestätigt, die beobachteten, dass der Bildung der charakteristischen DNA-Bruchstücke eine morphologische Veränderung der Mitochondrien vorausgeht. Die frühzeitige Schädigung von Mitochondrien in Form einer Störung der Elektronentransportkette und eines Anstiegs der Konzentration freier Sauerstoffradikale als Mechanismus der Zytotoxizität von TNF α ist auch bei anderen Zellen beschrieben worden (Schulze-Osthoff et al. 1992). Bezüglich der Bedeutung freier Sauerstoffradikale und von Stickstoffmonoxid für die GalN/LPS- bzw. -/TNF α -induzierten Schädigungen sind in der Literatur allerdings widersprüchliche Angaben zu finden (Bohlinger et al. 1996, Wang et al. 1998). In jedem Falle können Veränderungen in der Konzentration von Radikalen an verschiedenen Stellen sowohl bereits zu Beginn des apoptotischen

Zellunterganges in den Mitochondrien als auch bei der Anheftung und Extravasation von Granulozyten und der durch diese Zellen induzierten Nekrosen die Abfolge des TNF α -induzierten Geschehens hemmend oder fördernd beeinflussen (Schulze-Osthoff et al. 1992, Wang et al. 1998, Jaeschke et al. 1999, Jones et al. 1999). Neben der Hemmung der Transkription, die im GalN/LPS-Modell die Voraussetzung für die Entstehung der Apoptosen darstellt, können unabhängig von der Sensibilisierung durch GalN andere Faktoren die Entstehung von Apoptosen begünstigen, z.B. ausreichende ATP- und Glutathion-Konzentrationen und ein hoher Sauerstoffgehalt im Gewebe. Ein Fehlen dieser Voraussetzungen könnte eine Verschiebung der TNF α -Wirkung hin zu nekrotischen Zelluntergängen bei Leberschädigungen unterschiedlicher Genese, z.B. im septischen Schock erklären (Leist et al. 1996, Latta et al. 2000).

Bei der Sepsis sind neben TNF α primär IL6 und IL1 an der Ausprägung von Organschäden und systemischen Reaktionen wie Fieber bzw. Hypothermie, Hypotension, disseminierter intravasaler Gerinnung und Akut-Phase-Reaktion beteiligt (Dinarello 1989, Clinton et al. 1991, Schöbitz et al. 1992, Baumann und Gauldie 1994). Im Modell tritt die Erhöhung des Serumspiegels beider Zytokine zeitlich nach dem Serum-Peak von TNF α auf (Chensue et al. 1991). Sie ist mit TNF α -Antikörpern partiell hemmbar, d.h. Bildung und Ausschüttung, die nach LPS-Stimulus v.a. in Makrophagen und Endothelzellen erfolgt (Dinarello 1989, Le et Vilcek 1989, Zuckerman et al. 1989), sind teilweise durch TNF α induziert (Fong et al. 1989, Ulich et al. 1990, 1991, Luster et al. 1994). IL1 und TNF α wirken beim septischen Schock synergistisch (Okusawa et al. 1988, Everhaerd et al. 1989). Die Wirkung wird, wie auch bei IL6, durch spezifische Rezeptoren vermittelt, über die eine zusätzliche Regulierung auf Ebene der Zielzelle erfolgen kann (Dinarello 1989, Le und Vilcek 1989, Baumann und Gauldie 1994, De Kossodo et al. 1994). TNF α , IL6 und IL1 stehen an der Spitze einer Kaskade von weiteren Zytokinen und anderen biologisch aktiven Substanzen (Baumann und Gauldie 1994). Diese bilden ihrerseits ein Netzwerk sich verstärkender und hemmender Reaktionen, an dessen Ausprägung verschiedene Zellpopulationen und neben der Leber auch andere Organe wie Milz, Kreislaufsystem und Blut sowie Hypophyse und Nebenniere beteiligt sind (Rivier et al. 1989, Wendel 1990, Hiraoka et al. 1995). In ihrer Gesamtheit verursachen sie je nach Stärke des Reizes und entsprechend des Zustandes der Zielzellen die Entzündungsreaktionen und Zellschädigungen, wie sie bei der GalN/LPS-Hepatitis beobachtet werden können.

2.4 Dexamethason

Obwohl der Krankheitsverlauf bei Sepsis-Patienten durch eine Behandlung mit Dexamethason oder anderen Kortikosteroiden nicht positiv beeinflusst werden konnte (Bone et al. 1987, Hinshaw et al. 1987), schützt Dexamethason bei prophylaktischer Gabe im Tierversuch vor einer Leberschädigung durch GalN/LPS (Tiegs et al. 1989).

Die Mechanismen, die der antiphlogistischen Wirkung von Dexamethason bzw. Kortikosteroiden im allgemeinen zugrunde liegen, sind nur teilweise bekannt. Nachgewiesen wurde eine Hemmung der Freisetzung von Eikosanoiden, die auf einer Hemmung der Phospholipase A₂ beruht (Diaz et al. 1979). Bei der GalN/LPS-Hepatitis wurde eine Beteiligung von LTD₄ an der Organschädigung nachgewiesen. LTD₄ kann eine vorübergehende lokale Ischämie mit anschließender Reperfusion auslösen und damit Gewebsschädigungen induzieren, so dass eine Hemmung der LTD₄-Bildung die Kortikosteroidwirkung erklären könnte (Tiegs und Wendel 1988, Tiegs et al. 1989).

Zusätzlich hemmt Dexamethason den durch LPS oder GalN/LPS ausgelösten Anstieg des Serum-TNF α -Spiegels (Waage 1987, Remick et al. 1989) sowie den Serumanstieg von IL1, IL6 (Chensue et al. 1991, Ulich et al. 1991) und die TNF α - und IL1-Expression von Makrophagen (Chensue et al. 1991). Es konnte aber auch im Modell mit GalN/TNF α -Stimulation, d.h. jenseits der Wirkung von LTD₄ und TNF α , durch Vorbehandlung mit Dexamethason eine signifikante Reduktion der Leberschädigung erreicht werden (Tiegs et al. 1989). Beim Einsatz eines Steroidrezeptor-Antagonisten stiegen die TNF α -Konzentrationen in Serum, Leber und Milz nach LPS-Stimulus deutlich stärker an als bei Kontrolltieren (Lazar und Duda 1992). Außerdem wurde bei Zellen der Makrophagen-Monozytenlinie von einer Hemmung der LPS-induzierten Expression von TNF α bzw. IL1 auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene durch Dexamethason berichtet (Beutler et al. 1986, Knudsen et al. 1987, Lee et al. 1988, Waage und Bakke 1988, Zuckerman et al. 1989, Hoffmann et al. 1994). Nach Stimulation mit LPS werden vor allem durch IL1, aber auch durch TNF α und IL6 mittels neurohormonaler Steuerung über die Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse vermehrt endogene Kortikosteroide aus der Nebennierenrinde freigesetzt (Naitoh et al. 1988, Starnes et al. 1988, Rivier et al. 1989, Sharp et al. 1989), die ihrerseits zu einer Absenkung des TNF α -Spiegels führen (Zuckerman et al. 1989). Sowohl von natürlichen als auch von synthetischen Kortikosteroiden ist bekannt, dass sie wie andere Steroidhormone an spezifische intrazelluläre Rezeptoren binden und dass diese Hormon-Rezeptor-Komplexe mit der DNA im Zellkern in Wechselwirkung treten können (Carson-Jurica et al. 1990). Für IL6 sind im Bereich des zugehörigen Gens DNA-Sequenzen identifiziert worden, an die Glukokortikoid-Rezeptor-Komplexe binden. In vitro konnte damit durch Dexamethason die Transkriptionsrate von IL6 reduziert werden (Ray et al. 1990, Waage et al. 1990). Zusätzlich wird die TNF α -Wirkung unter dem Einfluss von Dexamethason durch die Abnahme der Affinität der TNF α -Rezeptoren reduziert (Kull 1988). Synthetische Glukokortikoide wie Dexamethason greifen im GalN/LPS-Modell also direkt auf Ebene der Zytokinsynthese und -expression in den Zellen des Immunsystems in das Netzwerk der immunologischen Reaktionen ein. Aufgrund der schützenden Wirkung auf verschiedenen Ebenen eignet sich Dexamethason gut als Vergleichssubstanz für die Beurteilung der pharmakologischen Wirkung des Immunmodulators Imexon im GalN/LPS-Modell.

2.5 Monoklonale Antikörper zur immunhistologischen Darstellung von Zellen des Abwehrsystems bei der Maus

Zur histologischen Differenzierung der verschiedenen Immunzellen stehen bei der Maus eine ganze Reihe monoklonaler Antikörper zur Verfügung, die spezifisch mit Determinanten einzelner Zellpopulationen reagieren (Ledbetter und Herzenberg 1979, Springer et al. 1979, Austyn und Gordon 1981, Coffman und Weissman 1981a, Kraal und Janse 1986). Durch die Selektivität dieser Antikörper, aber auch durch Veränderungen der Expression der Antigendeterminante, wird eine Beurteilung der Beteiligung entsprechender Zellpopulationen an immunologischen Reaktionen ermöglicht (Springer und Anderson 1986, Sunderkötter et al. 1991). Im Screening von pharmakologischen Wirkstoffen kann man deren Einfluss auf einzelne Zellpopulationen immunhistochemisch darstellen (Deschl et al. 1994).

Monoklonale Antikörper sind Immunglobuline, die von einem Plasmazellklon immunisierter Tiere nach Fusionierung mit Myelomzellen gebildet werden (Köhler und Milstein 1976, Springer 1981). Diese Antikörper sind immunchemisch identisch und weisen eine größere Spezifität auf als polyklonale Antikörper, da sie nur gegen ein Epitop des Antigens gerichtet sind.

2.5.1 Lymphozyten-Marker

2.5.1.1 Thy-1.2

Der monoklonale Ratte-anti-Maus Antikörper Thy-1.2 (Klon 30-H12) gehört zu den Immunglobulinen der Klasse IgG_{2b}. Die markierte Determinante hat ein Molekulargewicht von 25-30 kDa (Ledbetter und Herzenberg 1979, Hathcock 1991). Thy-1.1 und Thy-1.2 sind zwei Determinanten, die auf dem Thy-1-Antigen der Maus mit monoklonalen Antikörpern unterschieden werden können. Das Thy-1-Antigen ist eines der ersten Lymphozyten-differenzierungsantigene, die bei der Maus entdeckt wurden (Ledbetter und Herzenberg 1979). Mit der Identifizierung der Determinante Thy-1.2 ist eine Abgrenzung der Gesamtheit der T-Zellpopulation gegenüber B-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper möglich (Raff und Wortis 1970). Das Antigen wird auf Thymozyten und peripheren T-Zellen exprimiert. T-Vorläuferzellen sind vor ihrem Eintritt in den Thymus Thy-1.2-negativ. Thymozyten hingegen sind stark positiv. Bei der weiteren Reifung der Zellen nimmt die Antigendichte wieder ab (Basch und Kadish 1977, Ledbetter et al. 1980, Hathcock 1991). Außerdem ist das Antigen auch bei einem Teil der NK-Zellpopulation nachweisbar (Sun und Lohmann-Matthes 1982, Holmberg und Ault 1984). Untersuchungen von Hollander et al. (1980) deuten auf eine Beteiligung des Thy-1-Antigens auch bei der Mitogen-induzierten Proliferation von T-Zellen hin.

2.5.1.2 L3T4

Der monoklonale Antikörper L3T4 (Klon GK 1.5) gehört zu den Rattenimmunglobulinen der Klasse IgG_{2b} (Hathcock 1991, Karlsson-Parra et al. 1996). Das markierte Antigen hat ein Molekulargewicht von 52 kDa bei Bestimmung unter reduzierenden Bedingungen (Dialynas et al. 1983). Es entspricht dem CD4-Antigen bzw. dem humanen Leu3- oder T4-Molekül und ist auf Thymozyten und T-Helferzellen anzutreffen (Dialynas et al. 1983, Doyle und Strominger 1987, Hathcock 1991, Nakayama et al. 1994).

Das CD4-Molekül fungiert als Korezeptor des T-Zellrezeptors auf den T-Helferzellen. Es bindet direkt an MHC-Klasse II-Moleküle. Dadurch vermittelt das Antigen Zelladhäsion und ist an der Aktivierung der T-Helferzellen beteiligt (Doyle und Strominger 1987, Emmerich 1988, Weiss und Littman 1994). Mit Hilfe des spezifischen Antikörper L3T4 können eine MHC II-Antigen-abhängige Zytolyse und die Antigen induzierte Lymphokinproduktion blockiert werden (Dialynas et al. 1983, Emmerich 1988).

2.5.1.3 Lyt-2

Der monoklonale Antikörper Lyt-2 (Klon 53-6.7) gehört ebenfalls zu den Rattenimmunglobulinen der Klasse IgG_{2a} (Ledbetter und Herzenberg 1979). Der Antikörper markiert das CD8-Antigen auf Thymozyten und der T-Zellsubpopulation der zytotoxischen und T-Suppressorzellen (Ledbetter et al. 1981, Hathcock 1991). Das Antigen stellt ein Makromolekül dar, das sich aus den zwei durch Disulfidbrücken assoziierten Membran-Glykoproteinen CD8 α und CD8 β zusammensetzt, wobei der Antikörper Lyt-2 an die α -Untereinheit bindet. Bei Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen wurden für die CD8 α -Kette zwei Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 34 kDa (α') und 38 kDa (α) ermittelt (Ledbetter et al. 1981). Die Antigendichte variiert kaum zwischen Thymozyten und reifen T-Zellen, aber der Anteil an T-Zellen, die das Antigen exprimieren, nimmt bei der Reifung zum T-Lymphozyten durch die Differenzierung von Thymozyten (CD4⁺CD8⁺) in T-Helferzellen (CD4⁺CD8⁻) und zytotoxische und T-Suppressorzellen (CD4⁻CD8⁺) ab (Ledbetter et al. 1980, Dialynas et al. 1983, Rocha et al. 1992). In Milz und Lymphknoten treten die CD4- und CD8-positiven Zellen in einem Verhältnis von etwa 2:1 auf (Hathcock 1991). Beim Menschen wurde ein äquivalentes CD8-Antigen nachgewiesen. Es trägt die Bezeichnung Leu2 (Ledbetter et al. 1981, Hathcock 1991).

Das CD8-Antigen dient als Korezeptor des T-Zellrezeptors (Ledbetter et al. 1981, Connolly et al. 1990, Weiss und Littman 1994). Das mit Lyt-2 markierbare α -Glykoprotein bindet an die nicht-polymorphe Region des MHC I (Connolly et al. 1988, Norment et al. 1988). Über eine zytoplasmatische Komponente ist eine Übertragung von verstärkenden

oder inhibitorischen Signalen in die Zelle möglich (Weiss und Littman 1994). Durch Antikörper gegen das Lyt-2-Antigen können eine alloogenetische Stimulation und die zytotoxische Wirkung dieser T-Zellsubpopulation gehemmt werden (Nakayama et al. 1979, Hollander et al. 1980).

2.5.1.4 Ly-3.2

Der monoklonale Ratte-anti-Maus Antikörper Ly-3.2 (Klon 53-5.8) gehört zu den Immunglobulinen der Klasse IgG₁ (Ledbetter und Herzenberg 1979). Er reagiert mit dem CD8 β -Glykoprotein des CD8-Rezeptors (vgl. Kap. 2.5.1.3). Bei der Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen wurde ein Molekulargewicht von 30 kDa ermittelt. Der überwiegende Teil der zytotoxischen und T-Suppressorzellen exprimiert sowohl die α - als auch die β -Kette des CD8-Rezeptor (Ledbetter et al. 1981). Mit Hilfe von Antikörpern gegen CD8 β können die zytotoxische und die Suppressorwirkung dieser T-Lymphozyten gehemmt werden (Beverley et al. 1976, DiSanto et al. 1993). Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung legen eine Beteiligung des CD8 β -Glykoproteins an der MHC I-Bindung im Sinne einer Verstärkung und Erweiterung nahe (Karaki et al. 1992, Wheeler et al. 1992). Außerdem spielt das CD8 β -Antigen bei der Zellselektion während der T-Zellreifung im Thymus eine Rolle. Zellen, die außerhalb des Thymus reifen, weisen das CD8 β -Glykoprotein nicht auf. Sie exprimieren nur ein CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer. Sie stellen einen großen Anteil der intraepithelialen Darmlymphozyten und sind vereinzelt auch in Leber, Milz und Thymus zu finden (Rocha et al. 1992, Lin et al. 1993).

2.5.1.5 Ly5 (B220)

Der monoklonale Antikörper B220 (Klon RA3-6B2) ist ein Rattenimmunglobulin der Klasse IgG_{2b} (Asensi et al. 1989). Er reagiert mit dem CD45R-Antigen auf der Oberfläche von B-Lymphozyten (Mertsching et al. 1996, Smith et al. 1996). Das B220-Antigen hat ein Molekulargewicht von 220 kDa (Coffman und Weissman 1981b). Es gehört zur Familie der T200-Glykoproteine, die auf allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme der erythroischen Linie exprimiert werden. Diese Glykoproteine sind von einem einheitlichen Gen kodiert und bestehen aus drei Untereinheiten. Entsprechend der exprimierenden Zellpopulation unterscheiden sie sich v.a. im extrazellulären Teil. Die Transmembranregion und der zytoplasmatische Abschnitt variieren kaum (Coffman und Weissman 1981b, Tonks et al. 1990, Trowbridge 1991). Der Antikörper B220 markiert alle reifen und unreifen B-Lymphozyten sowie Pro- und Prä-B-Zellen im Knochenmark. Die Expression steigt mit der Reifung der B-Zelle. Plasmazellen exprimieren hingegen nur wenig oder kein B220-Antigen (Coffman und Weissman 1981a, 1981b, Mertsching et al. 1996, Smith et al. 1996).

Das CD45-Antigen ist an der Antigen-Rezeptor-vermittelten Immunantwort von B- und T-Zellen beteiligt (Weiss und Littman 1994). Der zytoplasmatische Anteil hat Protein-Tyrosin-Phosphatase-Aktivität und kann die Stärke aktivierender Signale modulieren (Fischer et al. 1990, Tonks et al. 1990, Trowbridge 1991).

2.5.2 Makrophagen-Marker

Makrophagen entwickeln sich aus einheitlichen promonozytischen Vorläuferzellen im Knochenmark, zeigen aber eine extreme Heterogenität in Bezug auf Phänotyp und Funktion. Die Subpopulationen werden v.a. durch das Differenzierungsstadium und das sie umgebende Gewebe geprägt (Kraal und Janse 1986, Rutherford et al. 1993). Sie können anhand sich unterscheidender Antigendeterminanten mit monoklonalen Antikörpern differenziert und charakterisiert werden (Ho und Springer 1984).

2.5.2.1 MAC-1

Der monoklonale Antikörper MAC-1 (Klon M1/70) ist einer der ersten Antikörper, die zur Markierung von Makrophagen bei der Maus zur Verfügung standen (Springer et al. 1978). Er gehört zur Klasse der IgG_{2b}-Immunglobuline und wird von Rattenmilzzellen nach Fusion mit NSI-Zellen gewonnen (Springer et al. 1978, Lopez et al. 1984). Die Antigendeterminante auf der Zelloberfläche besteht aus den zwei Glykoproteinen α und β (Beller et al. 1982, Kürzinger und Springer 1982). Bei der Analyse mit Elektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde ein Molekulargewicht von 190 kDa (α) bzw. 105 kDa (β) ermittelt (Springer et al. 1979).

MAC-1 wird von Granulozyten, NK-Zellen und v.a. von Zellen der Monozytenlinie exprimiert. Die Antigendichte steigt mit zunehmender Zellreife von Knochenmarkszellen über Monozyten bis hin zu ausdifferenzierten Makrophagen. Vor allem Peritoneal- und Milzmakrophagen exprimieren das Antigen stark. Makrophagen der B- und T-Zell-abhängigen Gebiete, dendritische Zellen sowie Lymphozyten und Erythrozyten reagieren nicht mit dem Antikörper (Springer et al. 1979, Ho und Springer 1982, Holmberg und Ault 1984, Matsumoto 1985). Auf den Kupfferzellen in der Leber konnte nur bei Signalverstärkung Antigen nachgewiesen werden (Springer et al. 1979, Ho und Springer 1982, Matsumoto 1985). Die Expression ist nicht tierartspezifisch. Der Antikörper zeigt auch Reaktionen mit den entsprechenden humanen Zellpopulationen, d.h. Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen (Ault und Springer 1981).

Das MAC-1-Antigen entspricht funktionell dem C3-Rezeptor, d.h. es stellt die Bindungsstelle für C3bi und dessen Abbauprodukte auf der Zellmembran dar (Beller et al. 1982, Kürzinger und Springer 1982). Es erfüllt damit eine wichtige Funktion bei der Phagozytose

opsonierter Partikel. Außerdem spielen das MAC-1-Antigen und Glykoproteine derselben Familie eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion und Zell-Zell-Interaktionen allgemein (Springer und Anderson 1986). So kann z.B. durch Stimulation mit chemotaktischen Stoffen bei Granulozyten und Monozyten die MAC-1-Expression aus einem latenten zytoplasmatischen Pool bis auf ein Fünffaches gesteigert werden (Springer et al. 1984).

2.5.2.2 F4/80

Der monoklonale Antikörper F4/80 ist ein Rattenimmunglobulin der Klasse IgG_{2b}. Das markierte Antigen hat ein Molekulargewicht von 160 kDa (Austyn und Gordon 1981). Es gehört der Familie der EGF-TM7-Oberflächenmoleküle an, die auf verschiedenen Leukozyten bei Mensch und Maus exprimiert werden. Die Moleküle dieser Familie stellen Proteinstrukturen dar, die die Bestandteile zweier bekannter Gruppen von Oberflächenantigenen in sich vereinen: die Gruppe der Epidermal growth factors (EGF) und die der G-Protein-linked Peptid-Hormon-Rezeptoren. Sie vereinen damit eine extrazelluläre mit einer transmembranösen Komponente (McKnight und Gordon 1996, 1998).

Das F4/80-Antigen wird ausschließlich auf Mausmakrophagen exprimiert (Austyn und Gordon 1981, Hume et al. 1983). Sowohl mononukleäre Zellen in Blut, Bauchhöhle und Knochenmark (Austyn und Gordon 1981) als auch Makrophagen der lymphatischen Organe und zahlreicher anderer Gewebe, u.a. Kupfferzellen (Hume et al. 1983, Lee et al. 1985, Gordon et al. 1992) reagieren positiv mit dem F4/80-Antikörper. Makrophagen der B-Zell- und T-Zellgebiete, mit Ausnahme des Thymus und periarteriell auch der Milz, sind weitestgehend F4/80-negativ (Hume et al. 1983, Kraal et al. 1987). Marginalzonenmakrophagen, marginalmetallophile Makrophagen, dendritische und interdigitierende Zellen zeigen keine Reaktion mit dem Antikörper (Nussenzweig et al. 1981, Hume et al. 1983, Dijkstra et al. 1985, Kraal und Janse 1986, Kraal et al. 1987). Die Antigen determinante ist hauptsächlich auf der Zellmembran lokalisiert. Ein kleiner intrazellulärer Pool macht ca. 25 % des Gesamtantigens der Zelle aus (Austyn und Gordon 1981, Lee et al. 1985).

Das F4/80-Antigen ist in frühen Stadien der Zellentwicklung bereits vorhanden. Die Stärke der Expression nimmt mit der Reifung der Makrophagen in vivo und auch in vitro mit der Dauer der Anzucht zu (Austyn und Gordon 1981, Hume et al. 1983). Sie nimmt außerdem bei Aktivierung der Zelle in Abhängigkeit von Aktivierungszustand, Stimulus und aktivierter Zellpopulation zu oder ab (Austyn und Gordon 1981, Hume et al. 1983, Lee et al. 1985, 1986). Die funktionelle Bedeutung dieses Antigens ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen, bei denen bei Makrophagen in vitro das Antigen durch monoklonale Antikörper blockiert wurde, weisen aber auf eine Funktion des Moleküls bei Zell-Zell-Interaktionen hin, die einen Einfluss auf die Zytokinausschüttung und damit auf die Aktivierungskaskade von

Makrophagen zu haben scheinen (Warschkau und Kiderlen 1999). Vergleichbare Funktionen sowie eine Bedeutung bei der Retention von Abwehrzellen in bestimmten Geweben oder bei Entzündungsreaktionen wurden auch bei der Untersuchung anderer Moleküle dieser Gruppe vermutet (McKnight und Gordon 1998, Stacey et al. 2001). Die Identifizierung eines Liganden sowie die Charakterisierung der Wirkmechanismen und der Bedeutung der Modulierung der F4/80-Expression im Rahmen der Zellaktivierung stehen allerdings noch aus (McKnight und Gordon 1998).

2.5.2.3 ER-TR9

Der monoklonale Antikörper ER-TR9 wird synthetisiert durch Fusion von sensibilisierten Rattenmilzzellen mit NA-1-Myelom-Zellen. Er gehört der Immunglobulinklasse IgM an. ER-TR9 markiert in der Milz ausschließlich die Marginalzonenmakrophagen, die durch ihre Lokalisation, den engen Kontakt zu Lymphozyten, eine starke Phagozytoseaktivität und die selektive Aufnahme neutraler Polysaccharide gekennzeichnet sind (Van Vliet et al. 1985). Auch in anderen lymphatischen Geweben sind mononukleäre Phagozyten nachweisbar, die das ER-TR9-Antigen auf der Oberfläche tragen, z.B. Makrophagen subsinusoidal und in den Marksträngen von Lymphknoten, auf der Serosaseite interfollikulär in den Peyerschen Plaques und in der Lamina propria von Dünndarmzotten. Im Thymus zeigen nur wenige Zellen im Mark eine schwach positive Reaktion. Kupfferzellen in der Leber reagieren nicht mit dem Antikörper. Der Marker bindet an eine Determinante auf der Zelloberfläche (Dijkstra et al. 1985, Kraal und Janse 1986). Diese ist in der Milz funktionell an der Aufnahme von Ficoll durch die Makrophagen beteiligt (Kraal et al. 1989).

2.5.2.4 MOMA-1

Der monoklonale Antikörper MOMA-1 ist ein Rattenimmunglobulin der Klasse IgG_{2a}. Er reagiert spezifisch mit den marginalmetallophilen Makrophagen in der Milz, einer Subpopulation ausdifferenzierter Makrophagen, die aufgrund ihrer charakteristischen Lokalisation am inneren Rand des Marginalsinus, einer sehr starken Aktivität der unspezifischen Esterase sowie gering ausgeprägter Phagozytosefähigkeit klar von den Marginalzonenmakrophagen abgegrenzt werden können. Zusätzlich zeigen die Makrophagen der roten Pulpa und nach LPS-Stimulus auch die Tingible-body-Makrophagen in den B-Zellarealen eine geringgradige Expression des Antigens (Kraal und Janse 1986). Dendritische Zellen reagieren nicht mit dem Marker. In Lymphknoten, Peyerschen Plaques und Dünndarmzotten ist das Antigen auf ER-TR9-positiven Makrophagen vorhanden. Weiterhin konnte es in der Lunge bei Makrophagen im interstitiellen Bindegewebe und Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden. Die Antigen determinante ist sowohl auf der Zellmembran als auch im Zytoplasma lokalisiert

(Kraal und Janse 1986, Bilyk und Holt 1991). Versuche an neugeborenen Mäuse weisen auf eine Beteiligung der Determinante bzw. der durch sie charakterisierten Zellen bei der Thymus-unabhängigen Immunantwort vom Typ 2 hin (Kraal et al. 1988).

2.5.2.5 MOMA-2

Der monoklonale Antikörper MOMA-2 ist ein Rattenimmunglobulin der Klasse IgG_{2b}. Der Antikörper reagiert mit einer Antigendeterminante, die bei der Mehrzahl der Gewebsmakrophagen in lymphatischen Organen sowie bei Monozyten und Vorläuferzellen im Knochenmark und in anderen Geweben, u.a. bei Kupfferzellen und Alveolarmakrophagen exprimiert wird. Charakteristisch ist die Reaktion mit den Makrophagen der B- und T-Zellgebiete der lymphatischen Organe, einschließlich der Tingible-body-Makrophagen, die nicht mit anderen Makrophagenmarkern, wie z.B. F4/80, markiert werden können. In der Marginalzone reagieren nur sehr wenige Makrophagen mit dem Antikörper MOMA-2. Marginalmetallophile Makrophagen sind MOMA-2-negativ. Das markierbare Antigen ist vor allem im Zytoplasma lokalisiert. Es konnte aber auch auf der Zellmembran nachgewiesen werden (Kraal et al. 1987). Bei dendritischen, interdigitierenden und Langerhans-Zellen sowie bei Peritonealmakrophagen sind abweichend von der starken flächigen Reaktion der oben genannten Makrophagen punktförmige zytoplasmatische Reaktionsprodukte beschrieben worden (Breel et al. 1987, Kraal et al. 1987).

Peritonealmakrophagen zeigen eine Verstärkung dieser zytoplasmatischen Expression des Antigen nach Stimulation mit Thioglykolat (Kraal et al. 1987). Bei den Alveolarmakrophagen wurde eine Makrophagensubpopulation mit Suppressoreigenschaften identifiziert, die durch die Expression des MOMA-2-Antigens gekennzeichnet ist (Bilyk und Holt 1991).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um weibliche Mäuse des SPF-Aufzuchtstammes NMRI/ Han Crl BR. Zu Versuchsbeginn sind die Tiere 6-8 Wochen alt und haben ein Gewicht von 29 g-31 g. Sie werden von der Firma WIGA Charles River, Sulzfeld, bezogen und bereits eine Woche vor Versuchsbeginn angeliefert, um eine ausreichende Adaptationsphase zu gewährleisten.

3.2 Versuchssubstanzen

3.2.1 Lipopolysaccharide (LPS)

Im Versuch wird LPS, gewonnen aus *Salmonella abortus equi* (Fa. Sebak, Tidenbach), verwendet. Die Stammlösung wird vor der Applikation mit PBS (vgl. Kap. 9.1.3.1), hergestellt aus Aqua bidest., auf eine Konzentration von 4 µg/ ml eingestellt.

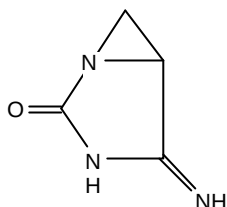
3.2.2 Galaktosamin (GalN)

Zur Sensibilisierung der Leber gegenüber LPS wird eine Lösung von Galaktosamin in der Konzentration 70 mg/ ml (Fa. Sigma Chemical Co, St.Louis, USA) verwendet.

3.2.3 Imexon

Der Immunmodulator, Imexon, gehört zur Substanzklasse der Aziridine. Die chemische Bezeichnung lautet 4-Imino-1,3-diazobicyclo-(3.1.0.)-hexan-2-on.

Strukturformel:

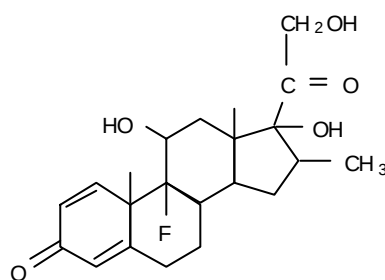


Die Substanz wurde von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH zur Verfügung gestellt; die interne Prüfbezeichnung lautet BM 06.002. Imexon wird in PBS (vgl. Kap. 9.1.3.1) gelöst in einer Konzentration von 6 mg/ ml verabreicht.

3.2.4 Dexamethason

Als Vergleichssubstanz zu Imexon dient das synthetische Glukokortikoid Dexamethason. Dessen chemische Bezeichnung lautet 9- α -Fluor-16- α -methylprednisolon.

Strukturformel:



Es wird in kristalliner Form als Dexamethason für Laborzwecke (Fa. Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) bezogen und nach Beschallung in einer Konzentration 0,1 mg/ ml in PBS (vgl. Kap. 9.1.3.1) suspendiert.

3.3 Antikörper für die immunhistologische Färbung und den TUNEL-Test

3.3.1 Monoklonale Antikörper

Die zur immunhistologischen Färbung verwendeten monoklonalen Antikörper sowie deren Spezifität und Bezugsquelle sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Monoklonale Antikörper

Antikörper ^a / markiertes Antigen ^b	Klon	Ig-Isotyp	markierte Zellpopulation ¹	Hersteller
Thy-1.2 ^b	30-H12	Rat IgG _{2b} ,κ	T-Gesamt-Zellpopulation	Fa. PharMingen ²
L3T4 ^b	GK1.5	Rat IgG _{2a} ,κ	T-Helfer-Zellen (CD4 ⁺)	Fa. PharMingen ²
Ly-2 ^b	53-6.7	Rat IgG _{2a} ,κ	zytotoxische und T-Suppressorzellen (CD8α ⁺)	Fa. PharMingen ²
Ly-3.2 ^b	53-5.8	Rat IgG ₁ ,κ	zytotoxische und T-Suppressorzellen (CD8β ⁺)	Fa. PharMingen ²
B220 ^b	RA3-6B2	Rat IgG _{2a}	B-Lymphozyten (CD45R ⁺)	Fa. Medac Diagnostika ³
MAC-1 ^b	M1/70 (9)	Rat IgG _{2b}	Makrophagen, NK-Zellen, Granulozyten	Fa. Boehringer Mannheim ⁴
F4/80 ^b	CI:A3-1	Rat IgG _{2b}	Makrophagen ¹	Fa. BMA Biomedicals AG ⁵
MOMA-1 ^a	MOMA-1	Rat IgG _{2a}	Makrophagensubpopulation ¹	Fa. BMA Biomedicals AG ⁵
ER-TR9 ^a	ER-TR9	Rat IgM	Makrophagensubpopulation ¹	Fa. BMA Biomedicals AG ⁵
MOMA-2 ^a	MOMA-2	Rat IgG _{2b}	Makrophagensubpopulation ¹	Fa. BMA Biomedicals AG ⁵
¹ Ausführliche Beschreibung der markierten Zellen im Literaturteil ² Fa. Pharmingen, San Diego, CA 92121, USA ³ Fa. Medac Diagnostika, Hamburg ⁴ Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim ⁵ Fa. BMA Biomedicals AG, Rheinstr.28-32, CH-4302 Augst (über DIANOVA GmbH Hamburg)				

3.3.2 Polyklonale Antikörper

- **IgG:** Fa. Cappel Organon Teknika Corporation, Durham, NC 27712, USA, horseradish peroxidase conjugated goat affinity purified polyclonal AB to mouse IgG F(ab')₂,
Lot Nr. 40641
- **IgM:** Fa. Cappel Organon Teknika Corporation, Durham, NC 27712, USA, horseradish peroxidase conjugated goat affinity purified polyclonal AB to mouse IgM (μ-chain),
Lot Nr. 40701

3.3.3 Sekundärantikörper und ABC-Komplex

- **biotinylierter Sekundärantikörper:** Fa. CAMON Vector Laboratories, Burlingame CA 94010 USA, Laborservice Wiesbaden, biotinylated rabbit anti rat IgG (H+L) affinity purified, mouse absorbed
Da der Antikörper sowohl mit den leichten als auch mit den schweren Ketten der Immunglobuline reagiert, kann er alle IgG-Subklassen, aber auch die leichten Ketten von IgA, IgE und IgM (vgl. Kap. 3.3) detektieren.
- **Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper:** Fa. DAKO Produktionsvej 42, 2600 Glostrup, Dänemark, peroxidase conjugated rabbit anti rat immunglobulins,
Lot Nr. 063
- **ABC-Peroxidase Kit:** Fa. CAMON Vector Laboratories, Burlingame CA 94010 USA, Laborservice Wiesbaden

3.3.4 TUNEL-Test

- **In Situ Cell Death Detection Kit, POD:** Fa. Boehringer Mannheim GmbH

3.3.5 Antikörper zur FACS-Analyse

- **Ly 5:** Fa. Medac Diagnostika Hamburg, Purified rat anti mouse B220 monoclonal AB, supernatant, Clone RA3-6B2, Isotype Rat IgG_{2a}, PE-gekoppelt
- **CD3:** Fa. Medac Diagnostika Hamburg, Purified hamster anti mouse monoclonal AB, Clone 500-A2, Hamster IgG, FITC-gekoppelt

3.4 Versuchsanordnung

3.4.1 Anzahl der Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Die Gesamtzahl der Tiere im Versuch beträgt 54. Diese werden 8 verschiedenen Gruppen zugeordnet, die sich in der Art der Behandlung und der Zeitdauer bis zur Tötung unterscheiden (vgl. Tab. 2). Jeweils zwei Gruppen werden der gleichen Behandlung unterzogen, dann aber zu verschiedenen Zeitpunkten, d.h. 7 h bzw. 24 h nach Verabreichung von GalN/LPS getötet. Die 7 h-Gruppen bestehen aus jeweils 6 Tieren, die 24 h-Gruppen aus jeweils 10 Tieren, um trotz eventuell früher verendender Tiere auch nach 24 h noch eine ausreichende Tierzahl zur Verfügung zu haben. Eine Stunde vor der Verabreichung von GalN/LPS wird nur PBS als Scheinbehandlung (LPS-Gruppe), Imexon (Imexon-Gruppe) oder Dexamethason (Dexamethason-Gruppe) injiziert. Außerdem werden 2 Kontrollgruppen zu je 3 Tieren gebildet. Den Tieren dieser Gruppen wird eine Stunde nach einer Scheinbehandlung mit PBS statt GalN/LPS auch nur PBS verabreicht. Die Tiere dieser Gruppen werden 7 h bzw. 24 h nach der zweiten PBS-Gabe getötet.

In einem zweiten Versuch werden vier Vergleichsgruppen zu je 3 Tieren gebildet. Die Tiere von 2 Gruppen erhalten nur Galaktosamin. Die Tiere der beiden anderen Gruppen nur LPS. Wieder wird je eine Gruppe nach 7 h, die jeweils andere nach 24 h getötet (vgl. Tab. 3).

Tab. 2: Versuchsgruppen

Gruppe/ verabreichte Substanzen	Tiernummern
Kontrollgruppe 7 h/ PBS	1 - 3
LPS-Gruppe 7 h/ PBS und GalN/LPS	4 - 9
Imexon-Gruppe 7 h/Imexon und GalN/LPS	10 - 15
Dexamethason-Gruppe 7 h/ Dexamethason und GalN/LPS	16 - 21
Kontrollgruppe 24 h/ PBS	22 - 24
LPS-Gruppe 24 h/ PBS und GalN/LPS	25 - 34
Imexon-Gruppe 24 h/ Imexon und GalN/LPS	35 - 44
Dexamethason-Gruppe 24 h/ Dexamethason und GalN/LPS	45 - 54
Präfinal oder agonal getötete Tiere ¹	6, 26, 29, 34, 36, 40
1 aus den LPS- und Imexon-Gruppen (vgl. Kap. 3.4.4)	

Tab. 3: Vergleichsgruppen

Gruppe/ verabreichte Substanz	Tiernummer
Vergleichsgruppe LPS 7 h/ LPS	1a - 3a
Vergleichsgruppe LPS 24 h/ LPS	4a - 6a
Vergleichsgruppe Galaktosamin 7 h/ GalN	7a - 9a
Vergleichsgruppe Galaktosamin 24 h/ GalN	10a - 12a

3.4.2 Applikation der Prüfsubstanzen

Imexon, Dexamethason oder PBS werden jeweils 1 h vor GalN/LPS i.p. injiziert. Die Dosis beträgt für Imexon 60 mg/ kg, das entspricht einem Applikationsvolumen von 0,3 ml pro Tier. Dexamethason wird in einer Dosierung von 1 mg/ kg, in einem Volumen von 0,3 ml pro Tier, verabreicht. Den scheinbehandelten Tieren wird das gleiche Volumen PBS verabreicht.

3.4.3 Applikation von GalN/LPS

LPS wird direkt nach D-Galaktosamin als getrennte Injektion i.p. appliziert. Die Dosierungen sind 700 mg/ kg für D-Galaktosamin bzw. 40 µg/ kg für LPS. Das Volumen jeder Lösung beträgt ebenfalls 0,3 ml pro Tier.

3.4.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Bei allen Tieren des Versuches wird 2 h nach Verabreichung von GalN/LPS zur Untersuchung einiger serologischer Parameter (vgl. Kap. 3.6.2) Blut entnommen. Eine erneute Blutentnahme erfolgt nach 7 h bzw. 24 h bei den überlebenden Tieren. Diese werden nach der Blutentnahme getötet und der Sektion (vgl. Kap. 3.5.4) zugeführt. Tiere, die früher ein prämortales Stadium erreichen, werden in der Agonie getötet (vgl. Tab. 2). Eine Blutentnahme vor der Tötung ist bei diesen Tieren nicht möglich.

3.5 Versuchsdurchführung

3.5.1 Haltungsbedingungen der Tiere

Die Mäuse werden in der Adaptationsphase (vgl. Kap. 3.1) und während des Versuches in den jeweiligen Gruppen zu 6 bzw. 10 Tieren in Makrolonkäfigen Typ 2 (Fa. Uno Roestvastall, B.V., Zevenaar), bei einer Temperatur von ca. 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 56-60 % gehalten. Die Belüftung erfolgt über eine Niederdruckklimaanlage, wobei den Tieren partikelarme Luft über ein Flow-Boxensystem zugeführt wird. Die Beleuchtungsdauer beträgt konstant 12 h, von 6 Uhr bis 18 Uhr, bei einer Beleuchtungsstärke von 60 Lux. Pellet-Futter der Marke Ssniff Spezialdiät für Ratten und Mäuse (Fa. Ssniff GmbH, Soest) sowie Wasser aus einer 300 ml-Makrolonflasche steht den Tieren zur freien Aufnahme zur Verfügung.

3.5.2 Applikation der Substanzen

Die Injektion der Substanzen in die Bauchhöhle erfolgt mit einer 1 ml-Tbc-Spritze und einer Kanüle mit 0,18 mm Durchmesser in der Leistengegend. Die Tiere werden dazu mit einer Hand mittels einer Hautfalte über den Schulterblättern bei gleichzeitiger Fixierung des Schwanzes auf dem Rücken liegend gehalten.

3.5.3 Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Tiere werden fixiert wie oben beschrieben. Durch den starken Druck im Genick kommt es zur Anstauung des retroorbitalen Venenplexus. Über den medialen Augenwinkel wird mit leicht drehenden Bewegungen ein Kapillarröhrchen (Capillary Tubes Natelson, Red Tips, gespült und entheparinisiert, Fa. Monoject Scientific, St.Louis) hinter dem Augapfel vorbei zur Blutentnahme in den gestauten Plexus geschoben. Beim Loslassen des Tieres kommt die Blutung sofort zum Stillstand. Auf diese Weise werden nach 2 h ca. 250 µl Vollblut (ein Kapillarröhrchen) und nach 7 h bzw. 24 h ca. 500 µl Vollblut (2 Kapillarröhrchen) entnommen.

Zur Gewinnung von Serum wird das Vollblut in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 3200 U/ min über 6 min zentrifugiert.

3.5.4 Sektion der Tiere und Fixierung des Materials

Sofort nach der Blutentnahme werden die Tiere durch Überstrecken des Genicks getötet. Die Sektion erfolgt direkt im Anschluss an die Tötung. Die Tiere werden auf einer Platte fixiert und ventral in der Medianen eröffnet. Von den Organen werden Leber und Milz gesondert entnommen. Die Leber wird zur Hälfte in Formalin (3,8 %iges Formaldehyd, gepuffert bei pH 7, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) eingelegt, die andere Hälfte wird in flüssigem Stickstoff konserviert. Dazu wird das Gewebe erst in stickstoffvorgekühltem Isopentan (2-Methyl-Butan, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) tiefgefroren, anschließend in Aluminiumdöschen (Fa. Serolab GmbH, Aidenbach) gegeben und darin in flüssigen Stickstoff überführt. Das tiefgefrorene Material wird bei -80°C in einer Ultratiefkühltruhe gelagert.

Die Milz wird direkt nach der Entnahme gewogen und danach in drei Teile geteilt. Ein Drittel wird gesondert gewogen und zur durchflusszytometrischen Analyse in 3 ml FACS/ PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) überführt. Dieses Gewebe wird durch Ausstreichen mit einem Glasstab homogenisiert. Die verbleibenden zwei Drittel jeder Milz werden wie die beiden Leberhälften jeweils in Formalin bzw. Stickstoff fixiert (siehe oben). Der ganze restliche Tierkörper wird in Formalin (siehe oben) eingelegt.

3.6 Untersuchungsmethoden

3.6.1 Klinische Untersuchung vor und während des Versuches

Die Tiere werden vor und alle 2 h während des Versuches adspektorisch beurteilt im Hinblick auf Verhalten und Allgemeinbefinden, Haarkleid, Körperhaltung, Haut-/Schleimhautfarbe bzw. Kreislaufbefund.

3.6.2 Serologische Untersuchungen

3.6.2.1 Bestimmung des TNF α -Serumspiegels

Zwei Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS wird im Serum der TNF α -Spiegel bestimmt.

Die quantitative Auswertung erfolgt mit Hilfe des Festphasen-ELISA:

Factor-Test TMm TNF α , Mouse Tumor Necrosis Factor ELISA-Test-Kit
(Fa. Genzyme, Cambridge, USA).

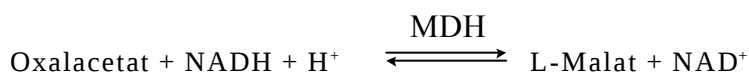
Bei diesem Test-Kit bindet das Serum-TNF α an fixierte, monoklonale Anti-mouse-TNF α -Antikörper vom Hamster. Nach Entfernen des Serums wird ein polyklonaler Anti-mouse-TNF α -Antikörper von der Ziege dazu gegeben, der an das gebundene Serum-TNF α bindet und dann seinerseits mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen Ziegen-Immunglobuline reagiert. Die entstandenen Immunkomplexe werden mit Hilfe des Peroxidase-Substrates POD BM Blue (Fa. Boehringer Mannheim) angefärbt. Durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm und Vergleich der Ergebnisse mit einer TNF α -Standardkurve kann nun die TNF α -Konzentration bestimmt werden. Die Extinktion ist proportional zum gebundenen, immunreaktiven TNF α .

Bis zu einer maximalen Konzentration von 25 ng/ ml (max. Konzentration im Standard) treten keine Kreuzreaktionen mit anderen Zytokinen (IL1, IL2, IL3, IL6, IFN γ und GM-CSF) auf. Die Nachweisgrenze liegt bei 50-100 pg/ ml bzw. 1,5-3 U/ ml in Serum, Plasma und Zellkultur.

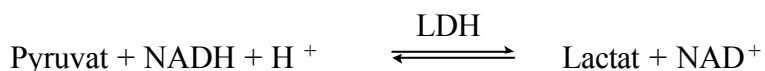
3.6.2.2 Bestimmung des Spiegels der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und der Alanin-Aminotransferase (ALAT) im Plasma

Die Bestimmung des Plasmaspiegels von ASAT bzw. ALAT wird bei den Blutproben vorgenommen, die zum Zeitpunkt der Tötung, d.h. nach 7 h bzw. 24 h, gewonnen wurden. Die Enzymaktivitäten werden photometrisch mit Hilfe des vollselektiven, diskreten Mehrfach-Analysensystems BM/ Hitachi 704 (Fa. Boehringer Mannheim) ermittelt. Bei dieser enzymkinetischen Methode wird die Aktivität des jeweiligen Enzymes mittels Substratumsetzung und nachfolgender Messung der Extinktion bestimmt. Die Messungen werden bei einer Wellenlänge von 415 und 340 nm und einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Zur Analyse werden zu 20 µl Serum nach Anweisung des Herstellers die Analysereagenzien zugesetzt.

Die ASAT-Aktivität wird mit Hilfe des Testes SYS1 BM/Hitachi 704/911 816337 (Fa. Boehringer Mannheim) bestimmt, nach dem Testprinzip:



Die ALAT-Aktivität wird mit Hilfe des Testes SYS1 BM/Hitachi 704/911 816442 (Fa. Boehringer Mannheim) bestimmt, nach dem Testprinzip:



Die Ergebnisse werden in der Einheit U/l angegeben.

3.6.3 Zytofluometrische Untersuchung

3.6.3.1 Vorbereitung des Blutes zur zytofluometrischen Untersuchung

Von dem vor der Tötung, d.h. nach 7 h bzw. 24 h entnommenen Vollblut werden direkt 40 µl entnommen und in ein 4 ml-Greiner-Röhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) überführt. Dem Blut wird zur Gerinnungshemmung Heparin in einer Konzentration von 10 % zugesetzt. Die jeweilige Antikörperlösung (Antikörperstammlösung 1 mg/ ml) wird im Verhältnis 1:50 mit FACS/PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) verdünnt. Davon werden 40 µl zu der Blutprobe gegeben und das Gemisch wird für 30 min auf Eis verbracht. Nach Zugabe von 1 ml FACS/PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) wird bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (Minifuge Fa. T. Heraeus, Hanau) und der Überstand dekantiert. Zur Auflösung der Erythrozyten wird 1 ml Lysereagenz (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) zugegeben und erneut bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (Minifuge Fa. T. Heraeus, Hanau) und dekantiert. Zur Entfernung von Zellresten und Bruchstücken wird dieser Vorgang mit 1 ml FACS/PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) nochmals wiederholt. Nach einem letzten Dekantieren wird das Zellpellet in 100 µl FACS/PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) resuspendiert und der FACS-Analyse zugeführt.

3.6.3.2 Vorbereitung der Milz zur zytofluometrischen Untersuchung

Die Zellzahl von dem Teil der Milz jedes Tieres, von dem zur FACS-Analyse eine Einzelzellsuspension hergestellt wurde, wird mit dem Coulter Counter bestimmt. Anhand des Gewichtsanteiles dieses Stückes am Gesamtmilzgewicht wird die Gesamtzellzahl der Milz ermittelt. Anschließend wird die Zellsuspension auf 2×10^7 Zellen je ml FACS/PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) eingestellt. Davon werden auf eine Mikrotiterplatte (V-Platte, Fa. Greiner, Nürtingen) 50 µl je Well gegeben und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (Minifuge Fa. T. Heraeus, Hanau). Nach Dekantieren des Überstandes wird das Zellpellet in 100 µl der jeweiligen Antikörperlösung (Antikörperstammlösung 1 mg/ ml in FACS/PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) im Verhältnis 1:100 verdünnt) resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nun werden die Zellen nochmals gewaschen, indem sie zweimal bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (Minifuge Fa. T. Heraeus, Hanau), dekantiert und in FACS/PBS (vgl. Kap. 9.1.1.1) resuspendiert werden. Die Fixierung erfolgt in 100 µl einer Paraformaldehydlösung (1 %ig in PBS).

3.6.3.3 FACS-Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse wird mit Hilfe eines FACS-Gerätes (FACScan, Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Zur Identifizierung der Zellpopulationen werden die Parameter Vorwärtslichtstreuung (Zellgröße), Seitwärtslichtstreuung (Zellgranularität) sowie die rote und grüne Fluoreszenz von jeweils 5×10^3 Zellen bestimmt. Durch grafische Auftragung der Vorwärts- gegen die Seitwärtslichtstreuung werden die Populationen der Monozyten und Lymphozyten unterschieden. Letztere können anhand ihrer Fluoreszenz als B-Lymphozyten, durch den PE-gekoppelten Antikörper rot fluoreszierend, bzw. T-Lymphozyten, durch den FITC-gekoppelten Antikörper grün fluoreszierend, identifiziert werden.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm Lysis-II (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg). Der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation wird bestimmt. Aus den errechneten Gesamtzellzahlen der Milzen werden mit Hilfe dieser Prozentsätze die absoluten Zellzahlen der einzelnen Populationen errechnet. Wegen der starken Schwankungen des Milzgewichtes und damit der Gesamtzellzahlen, die innerhalb der Versuchsgruppen substanzunabhängig auftraten, werden zur besseren Vergleichbarkeit bei der Auswertung vorrangig die Prozentzahlen betrachtet.

3.6.4 Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Nach der Adspektion des Gesamttieres und der Organe in den eröffneten Körperhöhlen werden Milz und Leber direkt nach der Entnahme adspektorisch auf Größe und Farbveränderungen sowie Stauungserscheinungen untersucht. Das Organgewicht der Milz wird mit Hilfe einer elektronischen Waage bestimmt. Nach dem Zerteilen der Organe für die jeweilige Fixierung wird die Anschnittsfläche beurteilt.

3.6.5 Pathologisch-histologische Untersuchungen

3.6.5.1 Pathologisch-histologische Untersuchungen am Paraffinschnitt

3.6.5.1.1 Vorbereitung des Gewebes

Zur Paraffineinbettung wird das fixierte Gewebe im Einbettungsautomaten (Hypercenter 2 R, Fa. Shandon, Southern Products Limited, Astmoor, England) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in das Intermedium Xylol überführt und anschließend mit Histoplast (Erstarrungspunkt $58-59^{\circ}\text{C}$, Fa. Sheerowd Medical, England) 2 x 2 h durchtränkt. Die Ausbettung erfolgt mit Hilfe des

Tissue TEK Gewebe Einbett Systems (Fa. W.Vogel GmbH und CoKG, Med. Technik und Elektronik, Gießen). Das durchtränkte Gewebe wird in Einbettgeschälchen gegeben und in Paraffinblöcke eingegossen.

Mit einem Schlittenmikrotom HN 40 (Fa. Reichert und Jung, Nußloch) werden von den vorgekühlten Blöcken Schnitte mit einer Dicke von 4-5 µm angefertigt und auf Eiweiß-Glycerin-beschichtete Objektträger (Fa. Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig) aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgt 30 min lang im Brutschrank bei 55°C.

3.6.5.1.2 Färbung

Die Schnitte werden mind. 30 min im Xylolbad (Fa. Merck, Darmstadt) entparaffiniert. Zur Vorbereitung auf die Färbung werden sie durch eine bis Aqua dest. absteigende Alkoholreihe geführt und verbleiben anschließend 20 min im Färbebad mit Hämalaun nach Mayer (vgl. Kap. 9.1.2.1). Danach werden sie 2 x 10 min in fließendem Leitungswasser gebläut, kurz in Aqua dest. gespült und 1-3 min mit Eosin 1 %ig (vgl. Kap. 9.1.2.2) gegengefärbt. Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. werden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder entwässert und verbleiben dann bis zum Eindecken im Xylolbad (Fa. Merck, Darmstadt). Das Eindecken erfolgt im Eindeckautomat, COVERAID (Fa. Sakura Finetechnical Co, Tokyo, Japan).

3.6.5.2 Pathologisch-histologische Untersuchungen am Kryostatschnitt

3.6.5.2.1 Vorbereitung des Gewebes

Die bei -80°C tiefgekühlten Organe werden im Kryostaten 2800 Frigocut E (Fa. Reichert und Jung, Cambridge Instruments, Nußloch) auf eine Boxtemperatur von -30°C erwärmt, mit dem Medium Tissue TEK O.T.C. Compound (Fa. Miles, Diagnostics Division, Elkhart, USA) auf die Objekthalter aufgefroren und mit C-Messern bei einer Objekttemperatur von -18°C geschnitten. Jeweils 4 Schnitte mit einer Dicke von ca. 7 µm werden als Schichtschnitte wechselnd mit einem Objektträger (Superfrost plus, Fa. Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig) für jeden Antikörper abgenommen und 10 min vor einem Ventilator luftgetrocknet. Die anschließende Fixierung der Schnitte erfolgt in 100 ml Azeton (Fa. Merck, Darmstadt) ebenfalls über 10 min unter Zusatz von 0,1 ml 30 %igem H₂O₂ (Fa. Merck, Darmstadt) zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Nach kurzem Abtrocknen vor dem Ventilator verbleiben die Objektträger bis zur weiteren Färbung in einer Trocken-kammer auf Trockenperlen mit Feuchteindikator (Fa. Neo-Lab, Laborspezialprodukte, Heidelberg).

3.6.5.2.2 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Vor der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin werden die getrockneten Kryostatschnitte in Aqua dest. überführt. Danach bleiben sie 5 min im Färbebad mit Hämalaun nach Mayer (vgl. Kap. 9.1.2.1). Es folgen die Bläuung in Leitungswasser über weitere 5 min und die Gegenfärbung mit Eosin 1%ig (vgl. Kap. 9.1.2.2) für ca. 15 sec. Entwässerung und Eindecken erfolgen wie in Kap. 3.6.5.1.2 für die Paraffinschnitte beschrieben.

3.6.5.2.3 Immunhistologische Färbung der Milz

Die immunhistologische Färbung der Milz wird nach der Avidin-Biotin-Methode bzw. für den Nachweis von IgG und IgM nach der direkten Peroxidase-Methode durchgeführt. Die optimale Verdünnung der primären und sekundären Antikörper sowie die am besten geeigneten Inkubationszeiten und -temperaturen wurden in Vorversuchen ermittelt.

Folgende Verdünnungen werden eingesetzt:

Thy-1.2	1:800
L3T4	1:150
Lyt-2	1:400
Ly-3.2	1:5
B220	1:300
IgG	1:50
IgM	1:50
MOMA-1	1:200
ER-TR9	1:80
F4/80	1:600
MOMA-2	1:200
MAC-1	1:50
biotinylierter Sekundärantikörper	1:100

Die Antikörper werden in PBS (vgl. Kap. 9.1.3.1) verdünnt, dem zur Reduktion von unspezifischen Bindungen 1 %iges BSA (Bovines Serum Albumin, Boserol 20T, Fa. Organon Teknika Corporation, Durham, NC 27712, USA) zugesetzt wird.

Vorbereitend werden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem wasserabweisenden Stift (DAKO-Pen, Fa. Dako patts, Glostrup, Dänemark) umrandet und in eine feuchte Kammer

überführt. Die Antikörperversdünnungen werden aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Schnitte 3 x 5 min in PBS gewaschen. Mit Ausnahme der mit den Antikörpern für IgG und IgM inkubierten werden alle Schnitte mit dem sekundären Antikörper bedeckt. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen an Mäuseimmunglobuline wird dem sekundären Antikörper ebenfalls 1 %ig BSA und zusätzlich Mäuseserum in einer Konzentration von 4,9 % zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer wird der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt. Als Peroxidaseträger kommt das ABC-Peroxidase-Kit (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010, USA, bezogen von Camon Labor Service, Wiesbaden) zum Einsatz. Nach Anweisung des Herstellers werden 10 ml PBS mit je 2 Tropfen Lösung A und Lösung B gemischt. Vor Gebrauch reagiert das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur und wird dann auf die Schnitte gegeben, die nun in der feuchten Kammer weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach einem dreifachen Waschvorgang in PBS folgt die abschließende enzymatische Farbreaktion aller Schnitte, einschließlich der mit Antikörpern für IgG und IgM inkubierten. DAB (3,3'-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid, Fa. Fluka AG, Buchs, Schweiz) wird in TRIS/HCl-Puffer, pH 7,65 (vgl. Kap. 9.1.3.2) in einer Konzentration von 0,05 % gelöst. Kurz vor der Reaktion werden 1,8 µl H₂O₂ zur Aktivierung der Peroxidase-Reaktion zugesetzt. Unter Mikroskopkontrolle werden die Schnitte mit der Lösung bis zu einer deutlichen Braunfärbung inkubiert. Zur Erzielung einer leichten Gegenfärbung der Kerne werden die Objektträger anschließend kurz in ein Bad mit Hämalaun nach Mayer (vgl. Kap. 9.1.2.1) getaucht und sofort danach in Leitungswasser gebläut. Entwässern und Eindecken erfolgt wie in Kap. 3.6.5.1.2 für die H.E.-Färbung beschrieben.

3.6.5.2.4 Immunhistologische Färbung der Leber

Die immunhistologische Färbung der Leber wird wegen des hohen Biotingehaltes in diesem Organ und der daraus resultierenden, starken unspezifischen Reaktionen des biotinylierten Sekundärantikörpers nach der indirekten Peroxidase-Methode durchgeführt. Die Antikörper kommen in folgenden Verdünnungen zum Einsatz:

F4/80	1:50
MAC-1	1:100
Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper	1:100

Zur Herstellung der Verdünnungen wird ebenfalls 1 %ig PBS/BSA verwendet. Vor dem Aufbringen der Antikörper werden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem wasserabweisenden Stift (DAKO-Pen, Fa. Dako patts, Glostrup, Dänemark) umrandet, in die feuchte Kammer überführt und zur Reduzierung unspezifischer Bindungen mit PBS/BSA 1 %ig 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wird die Lösung abgeschüttet, die Antikörperversdünnungen werden

aufgebracht und die Schnitte werden über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach drei Waschvorgängen in PBS wird der sekundäre Antikörper, versetzt mit 5 % reinem Mäuseserum, auf die Schnitte gegeben. Diese werden nun in der feuchten Kammer 40 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann nochmals dreimal in PBS gewaschen. Die abschließende enzymatische Farbreaktion, Kerngegenfärbung und Eindecken erfolgen wie in Kap. 3.6.5.2.3 bzw. Kap. 3.6.5.1.2 beschrieben.

3.6.5.2.5 TUNEL-Test

Der TUNEL-Test wird am Paraffinschnitt durchgeführt. Die Schnitte werden in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, Fa. Merck, Darmstadt) entparaffiniert und vor einem Ventilator luftgetrocknet. Nach 5 min Inkubation in 10 mM TRIS/HCl-Puffer (pH 7,5, vgl. Kap. 9.1.4.1) bei 37°C, werden die Schnitte 30 min in einer feuchten Kammer mit Proteinase K (Fa. Boehringer Mannheim) in einer Konzentration von 10 µg/ ml in 10 mM TRIS/HCl pH 7,5 bei 37°C angedaut. Es folgt ein dreifacher Waschvorgang in PBS bei 4°C. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgt über 15 min in 3 %igem H₂O₂ in PBS. Nach erneutem Waschen in PBS werden die Schnitte zur Perforation der Zellmembran 2 min mit 0,1 % Triton X-100 (Fa. Boehringer Mannheim) in 0,1 % Na-Citrat-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) auf Eis inkubiert und dann nochmals mit PBS gewaschen. Die eigentliche TUNEL-Reaktion wird mit dem In Situ Cell Death Detection Kit POD (Fa. Boehringer Mannheim) nach Kit-Vorschrift durchgeführt. Die TUNEL-Reaction-Mixture wird zu je 50 µl pro Schnitt auf die Objektträger in der feuchten Kammer gegeben, mit einem Deckglas (Hybri-Slips 22 x 22 mm, Fa. SIGMA CHEMICAL C.o.p.o., St. Louis MO., USA) abgedeckt, mittels Fixogum (Marabuwerke, GmbH & Co., Tamm) luftdicht verschlossen und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Schnitte mit PBS gewaschen. Dem sekundären Antikörper, Converter POD, des Kits wird reines Mäuseserum in einer Konzentration von 4,9 % zugesetzt. Je Schnitt werden 50 µl der Lösung aufgetragen und nach luftdichtem Abdecken (s.o.) wird wiederum 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Als farbgebendes Substrat dient auch hier 0,05 % DAB. Kerngegenfärbung und Eindecken werden, wie in Kap. 3.6.5.2.3 bzw. Kap. 3.6.5.1.2 beschrieben, durchgeführt.

3.6.6 Auswertung

Die qualitative Auswertung der gefärbten Gewebsschnitte erfolgt mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Fa. Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg).

Die Veränderungen und Verschiebungen innerhalb der Zellpopulationen werden semiquantitativ beurteilt.

In der Leber werden dem Ausmaß von Nekrosen oder Apoptosen folgende Werte zugeordnet:

Apoptosen:	1= wenige Zellen im gesamten Schnitt
	2= vermehrt Einzelzellen
	3= kleine Zellgruppen
	4= gehäuft
	5= die Mehrzahl der Zellen ist betroffen
Nekrosen:	0= nicht vorhanden
	1= Einzelzellen
	2= kleine Zellgruppen
	3= kleine Areale
	4= größere Areale
	5= konfluierende Brückennekrosen

In der Milz werden der Zellzahl und -dichte in einem Milzareal bei Anwendung der einzelnen Antikörper Werte zwischen 1 und 5 zugeordnet.

Für alle T-Zellmarker im Bereich von roter Pulpa, Marginalzone und PALS und für die B-Zellmarker in roter Pulpa und PALS sind den Zahlenwerten folgende Zelldichten zugeordnet:

- 1 = vereinzelte Zellen
- 2 = wenige Zellen gleichmäßig verteilt
- 3 = viele Zellen gleichmäßig verteilt
- 4 = Zellen dicht, Zwischenräume sichtbar
- 5 = Zellen dicht gedrängt, nicht voneinander abgrenzbar

Für die B-Zellen in der Marginalzone stehen die Werte für folgende Zellzahlen:

1 = vereinzelte Zellen am Übergang zu Follikel und PALS

2 = unterbrochener, meist ein- bis zweizelliger Zellgürtel

3 = lockerer, meist mehrlagiger Zellgürtel

4 = breiter, dichter Zellgürtel

5 = sehr breiter Zellgürtel, kaum Zwischenräume sichtbar

Die durchschnittlichen Werte jeder Gruppe geben in Form von Tabellen im Anschluss an die Beurteilung des jeweiligen Antikörpers Aufschluss über die tendenzielle Zu- oder Abnahme von Zellen einer Population.

3.6.7 Morphometrie

Die Verschiebungen innerhalb der B-Zellpopulationen in der Milz werden zusätzlich zur qualitativen Auswertung morphometrisch beurteilt. Dieser Beurteilung wird die Färbung mit dem B-Gesamt-Zellmarker, B220, zugrunde gelegt. Die Schnitte werden vom Mikroskop (Fa. Leitz, Wetzlar) durch eine Kamera (Colour Video Camera TK-1280 E, Fa. JVG, Japan) auf einen Bildschirm übertragen. Dort werden mit Hilfe des Bildverarbeitungs- und -analyse-system Quantimet 500 (Fa. Leica, Cambridge, England) von je 50 B-Zellfollikeln pro Milz und Tier der jeweils kleinste und größte Durchmesser ermittelt mit dem Ziel ,Veränderungen in der Größe der Follikel zu quantifizieren.

3.6.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Blutparameter und der Ergebnisse der FACS-Analyse wird mit Hilfe des zweiseitigen Man-Whitney-Testes durchgeführt, da eine Normalverteilung nicht in jedem Fall vorliegt. Dazu werden die beiden behandelten Therapiegruppen eines Tötungszeitpunktes jeweils mit der scheinbehandelten Therapiegruppe sowie letztere mit der Kontrollgruppe verglichen. Signifikanzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ werden mit *, $p < 0,01$ mit ** gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Befunde

Vor der Verabreichung der pharmakologischen Substanzen, Imexon oder Dexamethason bzw. PBS, und der anschließenden Stimulation mit GalN/LPS ist das Allgemeinbefinden der Tiere ungestört. Sie zeigen rege Bewegungsaktivität.

Bei den Tieren der Kontrollgruppen ist das Allgemeinbefinden auch im weiteren Verlauf des Versuches zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt.

Nach sieben Stunden sind die Tiere der beiden LPS- und Imexon-Gruppen in ihrer lokomotorischen Aktivität deutlich eingeschränkt. Das Fell ist glanzlos und gesträubt. Sie sind mittel- bis hochgradig apathisch. Die Akren und die sichtbaren Schleimhäute sind blass.

Auch in den Dexamethason-Gruppen sind etliche Tiere weniger bewegungsfreudig und einige haben stumpfes Fell. Blässe und Apathie treten aber in keinem Fall auf.

Nach vierundzwanzig Stunden haben sich die überlebenden Tiere aller drei Gruppen weitgehend erholt. Sie nehmen wieder aufmerksam an der Umgebung teil. Das Fell ist noch etwas stumpf. Die Bewegungsaktivität ist nur bei einigen Tieren noch geringgradig reduziert.

4.2 Mortalität

Im Verlauf des Versuches mussten insgesamt sechs Tiere, vier aus den LPS-Gruppen und zwei aus den Imexon-Gruppen, aufgrund ausgeprägter präfinaler oder agonaler Symptomatik vorzeitig getötet werden (vgl. Tab. 1). Alle sechs Tiere wurden zwischen der siebten und der neunten Stunde nach Verabreichung von GalN/LPS getötet. Ihr Anteil an der Gesamttierzahl pro Gruppe konnte durch die Behandlung mit Imexon von 25 % um die Hälfte auf 12,5 % reduziert werden. In der Dexamethason-Gruppe traten keine präfinalen Stadien auf (vgl. Tab. 2).

Tab. 1: Erkrankungsstadium und Zeitpunkt der vorzeitigen Tötung der einzelnen Tiere

Tiernummer	Gruppe	Zeitpunkt der Tötung [nach GalN/LPS-Inj.]	Stadium präfinal	Stadium Agonie
6	LPS-Gruppe 7 h	6 h 50 min		+
26	LPS-Gruppe 24 h	8 h 7 min	+	
29	LPS-Gruppe 24 h	6 h 44 min		+
34	LPS-Gruppe 24 h	7 h 41 min	+	
36	Imexon-Gruppe 24 h	6 h 36 min		+
40	Imexon-Gruppe 24 h	8 h 11 min	+	

Tab. 2: Einfluss der Behandlung auf die Zahl der vorzeitig getöteten Tiere je Gruppe

Therapiegruppe	Anzahl der vorzeitig getöteten Tiere
PBS-scheinbehandelte Tiere	4
Imexon-behandelte Tiere	2
Dexamethason-behandelte Tiere	0

4.3 Serologische Befunde

4.3.1 TNF α -Serumspiegel

Der TNF α -Serumspiegel erreicht zwei Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS bei den scheinbehandelten Tieren Mittelwerte von 1161 pg/ ml (7 h-Gruppe) bzw. 1202 pg/ ml (24 h-Gruppe). Gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe, denen nur PBS injiziert wurde, ist er somit signifikant erhöht (vgl. Tab. 3)

Die TNF α -Serumwerte in den Imexon-Gruppen liegen bei einem Mittel von 1622 pg/ ml (7 h-Gruppe) bzw. 2693 pg/ ml (24 h-Gruppe). Die Behandlung mit Imexon hemmt den TNF α -Serumanstieg nicht. Die Mittelwerte des TNF α -Serumspiegels ist nach Vorbehandlung mit Imexon gegenüber den scheinbehandelten Tieren erhöht. Diese Erhöhung ist aber nicht signifikant. Die Werte sind zwar bei einzelnen Tieren deutlich höher als in den LPS-Gruppen und weisen auch eine stärkere Streuung auf (vgl. Tab. 3, Abb. 1, Kap. 9.2.1.1, Kap. 9.2.1.2).

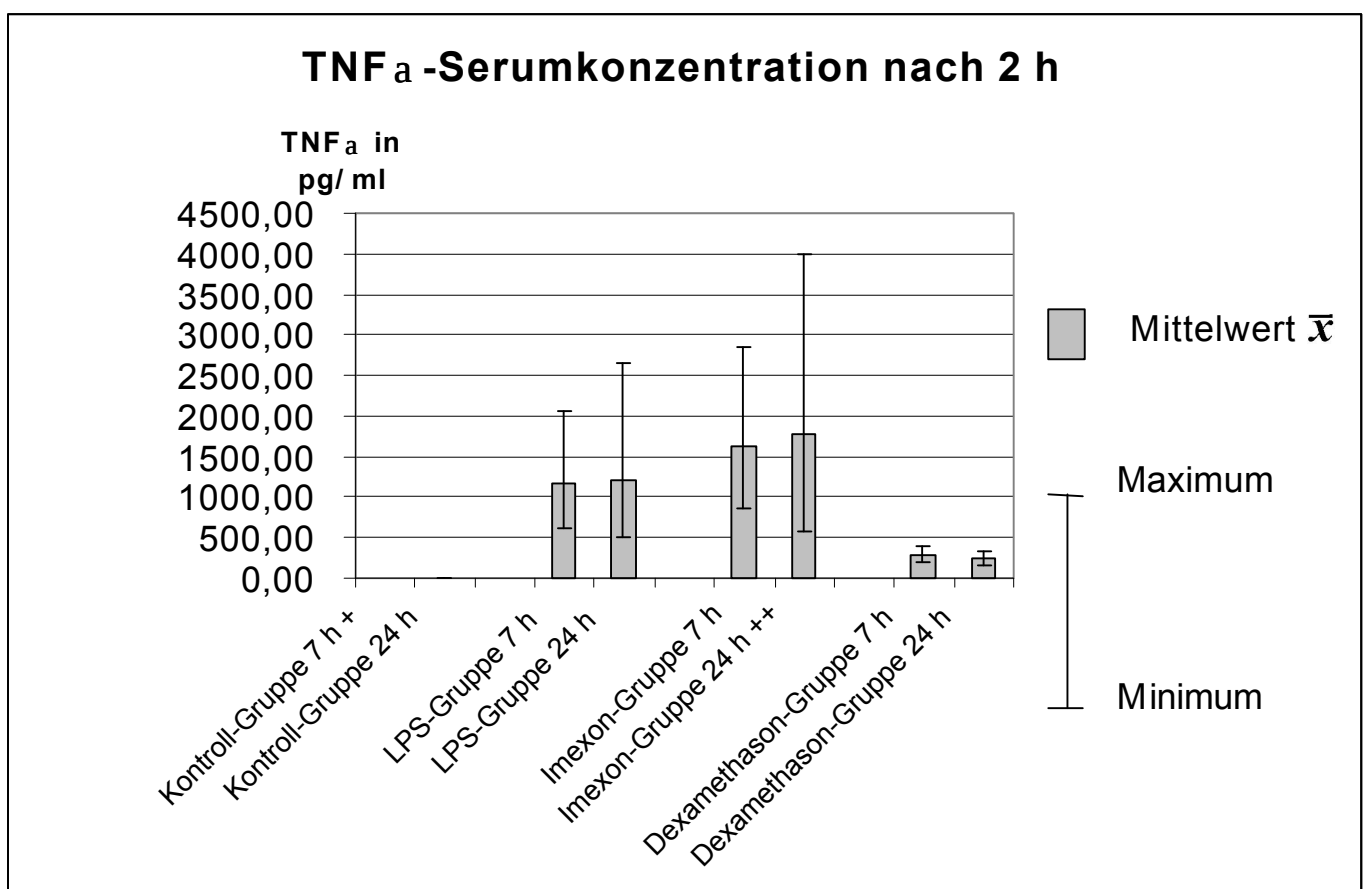
Tab. 3: TNF α -Serumspiegel (2 h-Werte)

Gruppe	Mittelwert $\bar{x}$ der TNF α -Serumkonzentration [nach 2 h in pg/ ml] (+/- SEM)
Kontrollgruppe 7 h	u. Nwg.
Kontrollgruppe 24 h	u. Nwg.
LPS-Gruppe 7 h	1161,33 (205,82)
LPS-Gruppe 24 h	1201,90 (182,24)
Imexon Gruppe 7 h	1621,83 (305,26)
Imexon-Gruppe 24 h	2692,80 (1184,38)
Dexamethason-Gruppe 7 h	288,17** (34,38)
Dexamethason-Gruppe 24 h	<237,67** (20,38)
** $p \leq 0,01$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.1.1 und Kap. 9.2.1.2	

Die Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen, die früher verenden, weisen keine auffällig veränderten Werte auf (vgl. Kap. 9.2.1.1, Kap. 9.2.1.2). Sie sind den ursprünglichen Gruppen zugeordnet.

In den Dexamethason-Gruppen liegen die Mittelwerte des TNF α -Serumspiegels bei 288 pg/ ml (7 h) bzw. <238 pg/ ml (24 h). Die Erhöhung des TNF α -Serumspiegels zwei Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS ist unter dem Einfluss von Dexamethason im Vergleich zu den scheinbehandelten Tieren signifikant reduziert (vgl. Tab. 3, Abb. 1).

Abb. 1: TNF α -Serumspiegel (2 h-Werte)



+ = unter der Nachweisgrenze

++ = der maximale Wert, 13061 pg/ ml, ist im Diagramm auf die Marke 4000 pg/ ml reduziert dargestellt, wird aber bei der Berechnung des Mittelwertes in voller Höhe berücksichtigt

4.3.2 ASAT-Plasmaspiegel

Sieben Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS steigt der ASAT-Plasmaspiegel bei der Mehrzahl der scheinbehandelten Tiere mit einem Mittelwert von 1546 U/l gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 241 U/l deutlich an (vgl. Tab. 4, Tab. 5, Abb. 2). Die Werte liegen zwischen 302 U/l und 2226 U/l. Aufgrund der Überschneidung des minimalen Wertes, der um 1244 U/l nach unten abweicht, mit dem Wertebereich der Kontrollgruppe, ist der Anstieg allerdings nicht signifikant im beurteilten Signifikanzbereich (vgl. Abb. 2, Kap. 3.6.8, Kap. 9.2.1.3).

Bei Behandlung mit Imexon liegt der Mittelwert für den ASAT-Plasmaspiegel nach sieben Stunden bei 746 U/l und ist damit gegenüber der LPS-Gruppe um über 50 % reduziert (vgl. Tab. 4). Der Anstieg ist bei der Mehrzahl der Tiere deutlich geringer als in der LPS-Gruppe. Aufgrund der starken Schwankungsbreite von 190 U/l bis 1848 U/l auch innerhalb der Imexon-Gruppe (vgl. Abb. 2, Kap. 9.2.1.3) ergibt sich auch für diese Abweichung keine Signifikanz im untersuchten Signifikanzbereich (vgl. Kap. 3.6.8).

Nach vierundzwanzig Stunden ist der ASAT-Plasmaspiegel im Durchschnitt noch weiter angestiegen. Es wird ein Mittelwert von 2145 U/l erreicht. Die Erhöhung ist damit gegenüber den Kontrolltieren nach vierundzwanzig Stunden signifikant (vgl. Tab. 5, Abb. 2).

Nach vierundzwanzig Stunden ist der ASAT-Plasmaspiegel auch in der Imexon-Gruppe noch stärker erhöht. Der Mittelwert beträgt jetzt mit 1514 U/l ca. 70 % des in der LPS-Gruppe erreichten Wertes (vgl. Tab. 5, Abb. 2). Für die Abweichung ergibt sich jedoch auch hier keine Signifikanz.

In den Dexamethason-Gruppen liegt der ASAT-Plasmaspiegel im Mittel bei 225 U/l (7 h-Gruppe) bzw. bei 804 U/l (24 h-Gruppe) (vgl. Tab. 4, Tab. 5, Abb. 2). Die Erhöhung des ASAT-Plasmaspiegels ist gegenüber den scheinbehandelten Tieren signifikant gehemmt.

Tab. 4: ASAT-Plasmaspiegel (7 h-Werte)

Gruppe	Mittelwert $\bar{x}$ der ASAT-Plasmakonzentration nach 7 h [in U/ l] (+/- SEM)
Kontrollgruppe	241 (66,20)
LPS-Gruppe ¹	> 1545,50 (425,81)
Imexon-Gruppe	746,33 (247,38)
Dexamethason-Gruppe	224,50 ^{**} (69,51)

1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt.

** $p \leq 0,01$ (U-Test),

Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.1.3

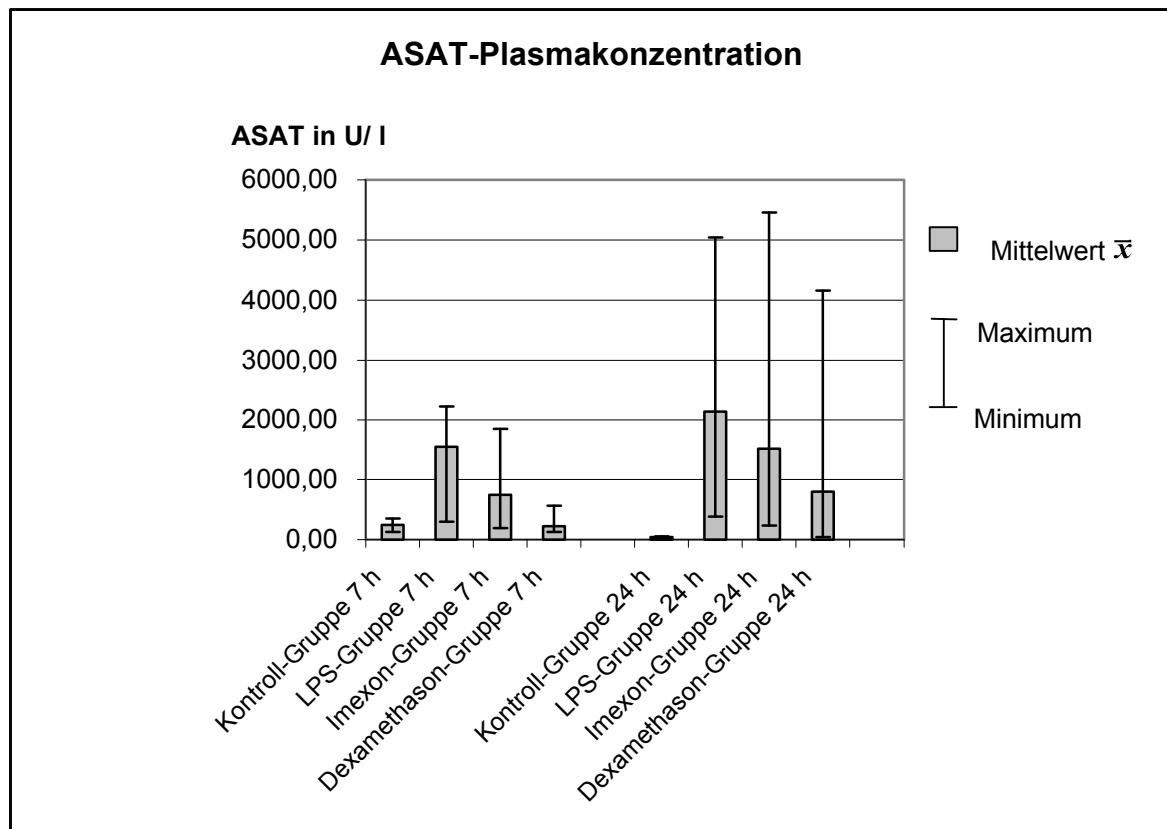
Tab. 5: ASAT-Plasmaspiegel (24 h-Werte)

Gruppe	Mittelwert $\bar{x}$ der ASAT-Plasmakonzentration nach 24 h [in U/ l] (+/-SEM)
Kontrollgruppe	46,67 (2,03)
LPS-Gruppe ¹	2145,43 [*] (638,08)
Imexon-Gruppe ¹	1513,75 (645,72)
Dexamethason-Gruppe	804,30 [*] (385,40)

1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt.

2 $p \leq 0,05$ (U-Test)

Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.1.4

Abb. 2: ASAT-Plasmaspiegel

4.3.3 ALAT-Plasmaspiegel

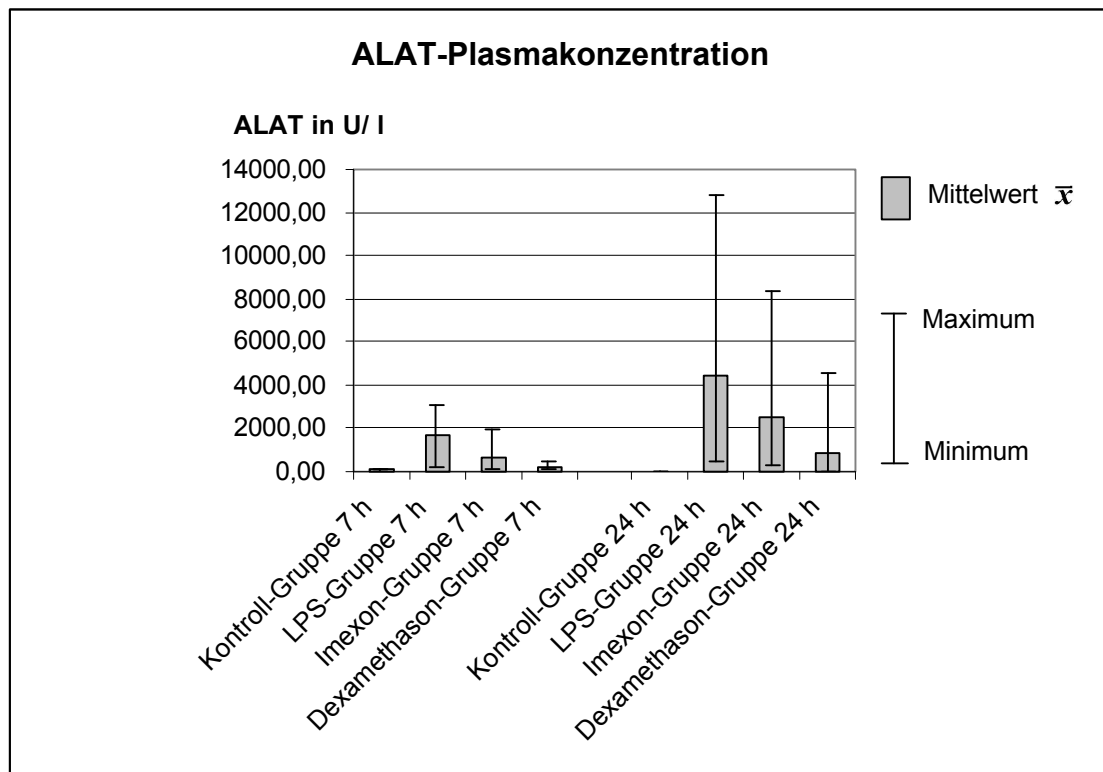
Die Erhöhung des ALAT-Plasmaspiegels verläuft parallel zu der des ASAT-Plasmaspiegels. Bei den Tieren der Kontrollgruppen sind die Werte im Durchschnitt etwas kleiner. Sie steigen aber bei den Tieren der LPS-Gruppen deutlich stärker als die ASAT-Werte und erreichen Mittelwerte von über 1627 U/l (7 h-Gruppe) bzw. 4491 U/l (24 h-Gruppe), so dass sich für beide LPS-Gruppen eine gegenüber den Kontrollgruppen signifikante Erhöhung ergibt. Für den Vergleich der anderen Gruppen gilt das in Kap. 4.3.2 für ASAT ausgeführte (vgl. Tab. 6, Tab. 7, Abb. 3). Die Hemmung durch die Behandlung mit Imexon beträgt ca. 60 % nach sieben Stunden und ca. 43 % nach vierundzwanzig Stunden.

Tab. 6: ALAT-Plasmaspiegel (7 h-Werte)

Gruppe	Mittelwert $\bar{x}$ der ALAT-Plasmakonzentration nach 7 h [in U/l] (+/- SEM)
Kontrollgruppe	82,67 (27,47)
LPS-Gruppe ¹	>1627* (621,00)
Imexon-Gruppe	654,67 (277,69)
Dexamethason-Gruppe	153,17** (54,75)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) ** $p \leq 0,01$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.1.3	

Tab. 7: ALAT-Plasmaspiegel (24 h-Werte)

Gruppe	Mittelwert $\bar{x}$ der ALAT-Plasmakonzentration nach 24 h [in U/l] (+/- SEM)
Kontrollgruppe	20,33 (8,69)
LPS-Gruppe ¹	4491,00* (1542,27)
Imexon-Gruppe ¹	2548,75 (1046,07)
Dexamethason-Gruppe	807,10** (429,54)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) ** $p \leq 0,01$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.1.4	

Abb. 3: ALAT-Plasmaspiegel

4.4 FACS-Analyse des peripheren Blutes

4.4.1 Lymphozyten im peripheren Blut

4.4.1.1 Gesamtlymphozyten

Durch die Stimulation mit GalN/LPS verringert sich der Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppen signifikant nach sieben und nach vierundzwanzig Stunden (vgl. Tab. 8, Tab. 9). Der Mittelwert der ausgezählten Zellen weicht um 35,3 % (7 h-Gruppe) bzw. 24,1 % (24 h-Gruppe) nach unten ab.

Imexon hat gegenüber der Scheinbehandlung nach sieben und vierundzwanzig Stunden keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut. Allerdings kommt es in dieser Gruppe zu einer noch breiteren Streuung der Einzelwerte.

Tab. 8: Lymphozytenzahl im peripheren Blut (7 h-Werte)

Gruppe	Anzahl der Lymphozyten in 5×10^3 ausgezählten Zellen nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/- SEM)	Prozentualer Anteil der Lymphozyten an den weißen Blutzellen im peripheren Blut nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/- SEM)
Kontrollgruppe	3202 (79,64)	68,18 % (1,93)
LPS-Gruppe ¹	2071,20* (159,71)	46,81 %* (2,82)
Imexon-Gruppe	2368,33 (193,52)	49,80 % (3,96)
Dexamethason-Gruppe	1212** (88,85)	25,25 %** (1,87)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) ** $p \leq 0,01$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.2.1		

Tab. 9: Lymphozytenzahl im peripheren Blut (24 h-Werte)

Gruppe	Anzahl der Lymphozyten in 5×10^3 ausgezählten Zellen nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/- SEM)	Prozentualer Anteil der Lymphozyten an den weißen Blutzellen im peripheren Blut nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/- SEM)
Kontrollgruppe	3455,33 (107,17)	79,80 % (1,28)
LPS-Gruppe ¹	2624,43* (229,43)	56,25 %* (3,60)
Imexon-Gruppe ¹	2176,38 (195,23)	49,81 % (4,27)
Dexamethason-Gruppe	3126,30 (134,62)	65,47 % (2,81)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.2.2		

Unter dem Einfluss von Dexamethason ist nach sieben Stunden der Lymphozytenanteil gegenüber der LPS-Gruppe nochmals signifikant reduziert (vgl. Tab. 8). Der Mittelwert der ausgezählten Zellen weicht um 41,5 % nach unten ab. Nach vierundzwanzig Stunden liegt der Lymphozytenanteil in der Dexamethason-Gruppe um 19,1 % über dem der LPS-Gruppe. Diese Abweichung ist jedoch nicht signifikant.

4.4.1.2 B- und T-Lymphozyten (B 220, CD3)

Durch die Stimulation mit GalN/LPS verringert sich der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten an den weißen Blutzellen im peripheren Blut im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe nach sieben Stunden signifikant von 50,28 % auf 37,97 % (vgl. Tab. 10). Der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten ist von 15,03 % auf 7,31 % auch deutlich verringert, aufgrund der Streuung und der geringen Stichprobenzahl liegt die Abweichung jedoch nicht im untersuchten Signifikanzbereich (vgl. Kap. 9.2.2.3, Kap. 3.6.8). Nach vierundzwanzig Stunden hingegen ergibt sich für den prozentualen Anteil der B-Lymphozyten an den weißen Blutzellen gegenüber der Kontrollgruppe mit 29,19 % eine signifikante Abweichung nach unten auf 17,25 %. Der Anteil der T-Lymphozyten weicht zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant ab.

Das Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten wird durch die Verabreichung von GalN/LPS nach sieben und vierundzwanzig Stunden nicht signifikant beeinflusst. Nach sieben Stunden ist bei der LPS-Gruppe lediglich eine Tendenz zur Erhöhung des T-Zellanteils erkennbar.

Imexon hat gegenüber der Scheinbehandlung weder einen Einfluss auf den Anteil der B- und T-Lymphozyten an den Leukozyten im peripheren Blut noch auf das Verhältnis der beiden Populationen untereinander (vgl. Tab. 10, Tab. 11). Der Anteil der B220⁺-CD3⁺-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten und an den weißen Blutzellen ist nach sieben Stunden in der Imexon-Gruppe gegenüber der LPS-Gruppe signifikant ($p \leq 0,01^{**}$) verringert (vgl. Tab. 12).

Unter dem Einfluss von Dexamethason ist nach sieben Stunden der Anteil der T- und B-Lymphozyten an den weißen Blutzellen gegenüber der LPS-Gruppe von 7,31 % auf 3,5 % nochmals signifikant reduziert (vgl. Tab. 10). Nach vierundzwanzig Stunden liegt keine signifikante Abweichung mehr vor.

Tab. 10: Anteil der B- und T-Lymphozyten des peripheren Blutes (7 h-Werte)

Gruppe	Prozentualer Anteil der B- und T-Lymphozyten an den weißen Blutzellen im peripheren Blut nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/- SEM)		Prozentualer Anteil der B- und T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten des peripheren Blutes nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)	
Antikörper	B 220 ⁺	CD3 ⁺	B 220 ⁺	CD3 ⁺
Kontrollgruppe	15,03 % (1,26)	50,28 % (2,49)	22,10 % (2,01)	73,68 % (2,05)
LPS-Gruppe ¹	7,31 % (1,70)	37,97 %* (2,91)	15,57 % (3,12)	81,08 % (3,64)
Imexon-Gruppe	7,81 % (1,40)	41,39 % (3,85)	15,80 % (2,48)	82,95 % (2,52)
Dexamethason-Gruppe	3,50 %* (0,83)	21,03 %** (1,76)	13,72 % (2,81)	83,36 % (2,81)
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * p<=0,05 (U-Test) ** p<=0,01 (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.2.3				

Tab. 11: Anteil der B- und T-Lymphozyten des peripheren Blutes (24 h-Werte)

Gruppe	Prozentualer Anteil der B- und T-Lymphozyten an den weißen Blutzellen im peripheren Blut nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/- SEM)		Prozentualer Anteil der B- und T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten im peripheren Blutes nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)	
Antikörper	B 220 ⁺	CD3 ⁺	B 220 ⁺	CD3 ⁺
Kontrollgruppe	29,19 % (3,40)	47,33 % (2,67)	36,49 % (3,89)	59,39 % (3,90)
LPS-Gruppe ¹	17,25 %* (1,40)	37,51 % (3,15)	30,94 % (2,13)	66,26 % (2,38)
Imexon-Gruppe ¹	15,68 % (1,70)	32,37 % (2,89)	31,38 % (1,70)	65,00 % (1,75)
Dexamethason-Gruppe	19,37 % (1,41)	43 % (2,18)	29,48 % (1,57)	65,84 % (2,11)
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * p<=0,05 (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.2.4				

Tab. 12: Anteil der B220/CD3-doppelt-negativen Lymphozyten des peripheren Blutes

Gruppe	Prozentualer Anteil der B220/ CD3-doppelt-negativen Lymphozyten an den weißen Blutzellen im peripheren Blut [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)		Prozentualer Anteil der B220/ CD3-doppelt-negativen Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten im peripheren Blut [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)	
	7 h	24 h	7 h	24 h
Zeitdauer bis zur Tötung				
Kontrollgruppe	2,65 (0,06)	2,89 (0,16)	3,90 (0,20)	3,63 (0,22)
LPS-Gruppe¹	1,38 (0,49)	1,29 (0,22)	3,06 (1,20)	2,48 (0,54)
Imexon-Gruppe¹	0,51** (0,06)	1,51 (0,22)	1,05** (0,14)	3,12 (0,39)
Dexamethason-Gruppe	0,64 (0,07)	2,23 (0,28)	2,58 (0,32)	3,37 (0,35)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. ** $p < 0,01$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.2.5 und Kap. 9.2.2.6				

4.4.2 Monozyten

Der Anteil der Monozyten an den weißen Blutzellen verändert sich weder bei Stimulation mit GalN/LPS verglichen mit den Kontrollgruppen, noch bei Behandlung mit Imexon oder Dexamethason gegenüber den LPS-Gruppen signifikant.

4.5 Milzgewichte

Die Milzgewichte unterliegen innerhalb aller Gruppen einer sehr breiten Streuung (vgl Kap. 9.2.3.1, Kap. 9.2.3.2). Die Abweichung ist in keiner der Therapiegruppen signifikant (vgl. Tab. 13).

Tab. 13: *Milzgewichte*

Gruppe	Milzgewicht nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$ in mg] (+/- SEM)	Milzgewicht nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$ in mg] (+/- SEM)
Kontrollgruppe	122,3 (11,67)	129 (12,77)
LPS-Gruppe¹	132,4 (13,38)	121,4 (9,29)
Imexon-Gruppe¹	106,2 (18,04)	103,9 (8,90)
Dexamethason-Gruppe	110,8 (3,88)	107,5 (5,93)
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.1 und Kap. 9.2.3.2		

4.6 Gesamtzellzahlen der Milz

Die Zahl der Gesamtzellen der Milz schwankt innerhalb der einzelnen Gruppen stark. Weder die Verabreichung von GalN/LPS noch die Behandlung mit Imexon oder Dexamethason haben einen Einfluss auf die Gesamtzellzahl. Eine Abhängigkeit der Zellzahl vom Milzgewicht ist nicht in jedem Fall erkennbar.

Tab. 14: Gesamtzellzahl der Milz

Gruppe	Gesamtzellzahl nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x} \times 10^7$ / Milz] (+/- SEM)	Gesamtzellzahl nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x} \times 10^7$ / Milz] (+/- SEM)
Kontrollgruppe	13,54 (0,47)	25,78 (1,58)
LPS-Gruppe ¹	19,55 (2,15)	19,06 (1,78)
Imexon-Gruppe ¹	17,34 (3,41)	16,56 (2,12)
Dexamethason-Gruppe	15,66 (1,65)	18,32 (1,44)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.1 und Kap. 9.2.3.2		

4.7 FACS-Analyse der Milz

In der LPS-Gruppe tritt nach sieben Stunden keine signifikante Abweichung des prozentualen Anteils der Gesamtlmphozyten an den Gesamtleukozyten der Milz im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Lediglich der Anteil der T-Lymphozyten ($CD3^+$) an den Gesamtlmphozyten nimmt in der LPS-Gruppe signifikant ab. Die Zunahme der B-Lymphozyten ($B220^+$) ist nicht signifikant.

Nach vierundzwanzig Stunden ist nach Stimulation mit GalN/LPS der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert. Eine leichte Verschiebung des Verhältnisses von B- zu T-Lymphozyten zugunsten der B-Lymphozyten ist zu erkennen. Sie ist jedoch nicht signifikant.

Die Behandlung mit Imexon hat sowohl nach sieben Stunden als auch nach vierundzwanzig Stunden keinen Einfluss auf die Gesamtlmphozytenzahl und das Verhältnis von B- zu T-Lymphozyten. Der prozentuale Anteil der $B220^+CD3^-$ -Zellen hingegen ist nach sieben Stunden leicht, nach vierundzwanzig Stunden signifikant ($p \leq 0,05^*$) reduziert (vgl. Tab. 19).

Die Werte der präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der Imexon-Gruppe unterscheiden sich nicht von denen der scheinbehandelten Tiere (vgl. Kap. 9.2.3.3.1, Kap. 9.2.3.3.3, Kap. 9.2.3.3.5).

Die Behandlung mit Dexamethason beeinflusst die durch die Verabreichung von GalN/LPS ausgelösten Veränderungen des Anteils der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten nicht.

Die Zahl der ausgezählten Monozyten weist nach sieben und vierundzwanzig Stunden innerhalb und zwischen den Gruppen nur minimale Schwankungen auf.

Aufgrund der Schwankungen im Milzgewicht und somit in der Gesamtzellzahl der Milz (vgl. Tab. 13, Tab. 14) ist ein aussagekräftiger Vergleich der absoluten Zellzahlen pro Milz nicht möglich (vgl. Kap. 3.6.3.3).

Tab. 15: Lymphozytenzahl in der Milz (7 h-Werte)

Gruppe	Lymphozytenzahl nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$ x 10⁷/ Milz] (+/- SEM)	Prozentualer Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten der Milz nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)
Kontrollgruppe	12,16 (0,24)	89,91 % (1,57)
LPS-Gruppe¹	19,66 (3,16)	91,3 % (0,45)
Imexon-Gruppe	15,93 (3,11)	91,92 % (0,36)
Dexamethason-Gruppe	13,93 (1,44)	88,97 % (0,96)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.3.1		

Tab. 16: Lymphozytenzahl der Milz (24 h-Werte)

Gruppe	Lymphozytenzahl nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x} \times 10^7$ / Milz] (+/- SEM)	Prozentualer Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten der Milz nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)
Kontrollgruppe	23,42 (1,35)	90,89 % (1,28)
LPS-Gruppe ¹	16,29 (1,53)	85,51 %* (0,82)
Imexon-Gruppe ¹	14,10 (1,86)	85,13 % (1,14)
Dexamethason-Gruppe	15,55 (1,27)	85,02 % (0,79)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.3.2		

Tab. 17: B- (B220⁺) und T-(CD3⁺) Zellen der Milz (7 h-Werte)

Gruppe	Zahl der B- und T-Zellen nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x} \times 10^7$ / Milz] (+/- SEM)		Prozentualer Anteil der B- und T- Zellen an den Gesamtlmphozyten der Milz nach 7 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)	
Antikörper	B220 ⁺	CD3 ⁺	B220 ⁺	CD3 ⁺
Kontrollgruppe	5,90 (0,36)	4,97 (0,17)	48,46 % (2,13)	40,83 % (0,62)
LPS-Gruppe ¹	9,27 (0,78)	5,7 (1,09)	52,63 % (2,17)	31,05 %* (2,97)
Imexon-Gruppe	8,7 (1,57)	5,69 (1,33)	55,30 % (1,21)	34,58 % (1,11)
Dexamethason-Gruppe	7,76 (0,86)	4,51 (0,60)	55,43 % (1,48)	32,55 % (2,61)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.3.3				

Tab. 18: B (B220⁺)- und T (CD3⁺)-Zellen der Milz (24 h-Werte)

Gruppe	Zahl der B- und T-Zellen in der Milz nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$ x 10 ⁷ / Milz] (+/- SEM)		Prozentualer Anteil der B- und T-Zellen an den Gesamtlymphozyten der Milz nach 24 h [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)	
Antikörper	B220 ⁺	CD3 ⁺	B220 ⁺	CD3 ⁺
Kontrollgruppe	11,43 (0,61)	8,80 (0,46)	48,85 % (0,90)	37,92 % (3,43)
LPS-Gruppe ¹	8,91 (0,84)	5,74 (0,67)	54,68 % (1,95)	34,84 % (1,05)
Imexon-Gruppe ¹	7,76 (1,03)	5,38 (0,79)	55,04 % (1,31)	38,06 % (1,39)
Dexamethason-Gruppe	8,83 (0,73)	5,97 (0,47)	53,78 % (1,85)	38,88 % (1,63)
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.3.4				

Tab. 19: B220/CD3-doppelt-negative Lymphozyten der Milz

Gruppe	Zahl der B220/CD3-doppelt- negativen Lymphozyten [Mittelwerte $\bar{x}$ x10 ⁷ / Milz] (+/-SEM)		Prozentualer Anteil der B220/CD3- doppelt-negativen Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten der Milz [Mittelwerte $\bar{x}$] (+/-SEM)	
Zeitdauer bis Tötung	7 h	24 h	7 h	24 h
Kontrollgruppe	1,08 (0,30)	2,89 (1,11)	9,00 (2,68)	11,99 (3,99)
LPS-Gruppe ¹	2,47 (0,57)	1,06 (0,24)	13,95 (3,41)	6,48 (1,16)
Imexon-Gruppe ¹	1,21 (0,25)	0,47 (0,09)	7,63 (0,86)	3,33* (0,51)
Dexamethason-Gruppe	1,31 (0,32)	0,95 (0,34)	9,55 (1,96)	5,49 (1,69)
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * p<= 0,05 (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.3.5 und Kap. 9.2.3.3.6				

4.8 Pathologisch-anatomische Befunde der Leber

Sieben Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS ist die Leber bei den meisten Tieren der LPS-Gruppe und bei den präfinal oder in der Agonie getöteten Tieren der LPS- und der Imexon-Gruppe etwas vergrößert und vermehrt blutgefüllt. Bei manchen Tieren sind die Ränder des Organes abgerundet. Es tritt eine tief dunkelrote, teilweise fleckig bis marmorierte Verfärbung ein.

Gleichartige Veränderungen sind in der Imexon-Gruppe nur bei einzelnen Tieren vorhanden. In der Dexamethason-Gruppe weicht die Größe kaum, die Farbe nur seltener von denen der Kontrolltiere ab.

Nach vierundzwanzig Stunden ist die Vergrößerung in allen Gruppen geringer ausgeprägt. Das Lebergewebe ist von rotbräunlicher Farbe, bei einigen Tieren der LPS-Gruppe auch leicht rotgelblich marmoriert. Nur in dieser Gruppe ist die Blutfülle bei manchen Tieren noch geringgradig vermehrt.

4.9 Pathologisch-histologische Befunde der Leber

4.9.1 Kontrollgruppen

Die Leber bei den Kontrolltieren ist bis auf vereinzelte mononukleäre Infiltrate ohne histopathologischen Befund. Die Hepatozyten bilden säulenartig geordnete Strukturen. Teilweise befinden sich innerhalb der Gefäße Blutbestandteile. In den Sinusoiden sind solche nur seltener vorhanden (vgl. Abb. 4a).

4.9.2 Vergleichsgruppen für die isolierte Applikation von GalN bzw. LPS

Sieben Stunden nach alleiniger Verabreichung von GalN zeigt die Leber bei allen Tieren der Gruppe vor allem periportal eine deutliche großtropfige bis vakuolige Degeneration. Nach vierundzwanzig Stunden hat sich die vakuolige Degeneration verstärkt und in Richtung Zentralvene ausgeweitet.

Auch unter dem alleinigen Einfluss von LPS ist nach sieben Stunden eine vakuolige Degeneration der Leberzellen erkennbar, die periportal verstärkt ist. Die Zahl der Granulozyten ist gegenüber den Kontrolltieren geringgradig erhöht. Vierundzwanzig Stunden nach LPS-Gabe ist die vakuolige Degeneration noch immer deutlich sichtbar.

4.9.3 Therapiegruppen

4.9.3.1 7 h-Gruppen

Nach sieben Stunden wird in der LPS-Gruppe und bei den in der Agonie getöteten Tieren das histologische Bild von ausgeprägten Apoptosen dominiert (vgl. Tab. 20). Viele Zellen zeigen typische Merkmale wie Zellschrumpfung und Chromatinkondensation mit gut sichtbarer Chromatinmarginierung an die nukleäre Membran und mit Kernfragmentierung. Auch kugelige hyaline Gebilde, die sogenannten apoptotischen Körperchen, sind zu finden (vgl. Abb. 4b, Abb. 5b). Sie sind überwiegend phagozytiert in benachbarten Hepatozyten lokalisiert. Die Zahl der apoptotisch veränderten Zellen ist zentral am größten und nimmt zur Peripherie des Läppchens hin immer mehr ab.

Besonders stark erkrankte Tiere zeigen im perizentralen Bereich vermehrt auch große eosinophile nekrotische Zellen, die im Zytoplasma zum Teil freies Chromatin, zum Teil Kerntrümmer enthalten. Die Bälkchenstruktur ist kaum noch zu erkennen (vgl. Abb. 5b).

Neben der vermehrten Blutfülle in Gefäßen und Sinusoiden kommt es in den stark nekrotischen Gebieten zu Hämorrhagien. Blutbestandteile sind frei im Gewebe sichtbar (vgl. Tab. 20, Abb. 4b, Abb. 5b).

Eine starke Infiltration von Granulozyten ist im gesamten Gewebe zu erkennen. Vor allem in den nekrotischen Gebieten treten sie vermehrt auf. Außerdem kommt es in den Sinusoiden vermehrt zum Granulozyten-Sticking.

Bei der Imexon-Gruppe sind die Veränderungen der Hepatozyten weniger stark ausgeprägt. Apoptotische Zellen sind in deutlich geringerer Zahl (vgl. Tab. 20, Abb. 4c) und nur perizentral bis intermediär vorhanden. Bei manchen Tieren sind ganz vereinzelt auch nekrotische Zellen sichtbar. Die Gewebsstruktur bleibt jedoch weitgehend erhalten. Obwohl Gefäße und Sinusoide teilweise leicht gestaut erscheinen, kommt es in keinem Fall zu Hämorrhagien (vgl. Tab. 20). Granulozyten-Sticking ist in vielen Sinusoiden erkennbar. Um nekrotische Zellen kommt es auch zur Infiltration von Granulozyten (vgl. Abb. 4c).

Bei den präfinal oder in der Agonie getöteten Tieren der LPS- und der Imexon-Gruppe sind die Veränderungen der Zellen und die Hämorrhagien so stark ausgeprägt, dass die Lebergewebsstruktur kaum noch zu erkennen ist. Apoptotische Zellen sind in großer Zahl ohne spezifische Lokalisation vorhanden, aber auch die Zahl der Nekrosen ist im gesamten Gewebe deutlich erhöht.

Nach Behandlung mit Dexamethason zeigen nur Einzeltiere eine geringgradige Zunahme der Apoptosehäufigkeit (vgl. Tab. 20, Abb. 4d). Die Apoptosen sind auch hier perizentral gelegen. Nekrosen treten nicht auf. In einigen Gefäßräumen befinden sich Anhäufungen von Blutbestandteilen und Granulozyten. Es kommt vermehrt zum Granulozyten-Sticking.

Bei allen Tieren zeigen etliche Zellen Anzeichen von vakuoliger Degeneration. Nach Dexamethason-Behandlung treten diese Veränderungen in geringerem Maße auf.

4.9.3.2 24 h-Gruppen

Nach vierundzwanzig Stunden beherrschen vor allem in der LPS-Gruppe ausgeprägte eosinophile Flächennekrosen das Bild (vgl. Tab. 20, Abb. 6a, Abb. 7a). Sie schwanken in ihrer Ausdehnung von schmalen Bereichen um die Zentralvene bis hin zu konfluierenden Brückennekrosen. In diesen konfluierenden Nekrosen treten auch leichte Hämorrhagien auf. Außerdem kommt es zu einer starken Infiltration von Granulozyten und Makrophagen in die nekrotischen Areale. Apoptosen sind nur ganz vereinzelt sichtbar.

Bei der Imexon-Gruppe sind die Nekrosen in ihrer Ausprägung schwächer (vgl. Tab. 20, Abb. 6b) und vorwiegend perizentral gelegen. Auch hier kommt es aber innerhalb der nekrotischen Bereiche zur verstärkten Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen. Apoptosen sind nur ganz vereinzelt vorhanden.

Unter dem Einfluss von Dexamethason ist zu diesem Zeitpunkt bei allen Tieren die Zahl apoptotisch veränderter Zellen im Lebergewebe leicht erhöht. Bei Einzeltieren treten Apoptosen sogar stark gehäuft auf (vgl. Abb. 6c, Abb. 7b). Die nach vierundzwanzig Stunden unter dem Einfluss von Dexamethason auftretenden histopathologischen Leberveränderungen sind vergleichbar mit den Veränderungen, die in der LPS- oder der Imexon-Gruppe nach sieben Stunden aufgetreten sind. Es kommt also zu einer Verschiebung im zeitlichen Auftreten der Veränderungen. Neben Apoptosen sind auch einige vergrößerte eosinophile nekrotische Zellen sichtbar, um die sich kleine, dichte Nester von Granulozyten gebildet haben. Bei einem Tier treten kleinere nekrotische Areale auf (vgl. Tab. 20).

Bei allen Tieren ist eine vakuolige Degeneration von Zellen in nur geringem Maße vorhanden.

Tab. 20: Lebergewebszerstörung H.E.-Färbung

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe ¹			Apoptosen	Nekrosen	Hämorrhagien
Kontrollgruppe	7 h	(3)	1	0	-
LPS-Gruppe	7 h	(5)	4-5	1-2	+
Imexon-Gruppe	7 h	(6)	2-3	0(-1 ²)	-
Dexamethason-Gruppe	7 h	(6)	1(-2 ²)	0	-
Kontrollgruppe	24 h	(3)	1	0	-
LPS-Gruppe	24 h	(7)	1	4-5	(+ ³)
Imexon-Gruppe	24 h	(8)	1	3-4	-
Dexamethason-Gruppe	24 h	(10)	2-4	0(-3 ^{2a})	-
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. 2 nur bei einzelnen Tieren auftretend 2a nur bei einem Tier 3 nur im Bereich konfluierender Nekrosen Zahlenwerte entsprechen der Zelldichte (vgl. Kap. 3.6.6): Apoptosen: von 1 = wenige Zellen im gesamten Schnitt bis 5 = die Mehrzahl der Zellen ist betroffen Nekrosen: von 0 = nicht vorhanden bis 5 = konfluierende Brückennekrosen erfassen große Teile des Gewebes Hämorrhagien: - = nicht vorhanden + = vorhanden					

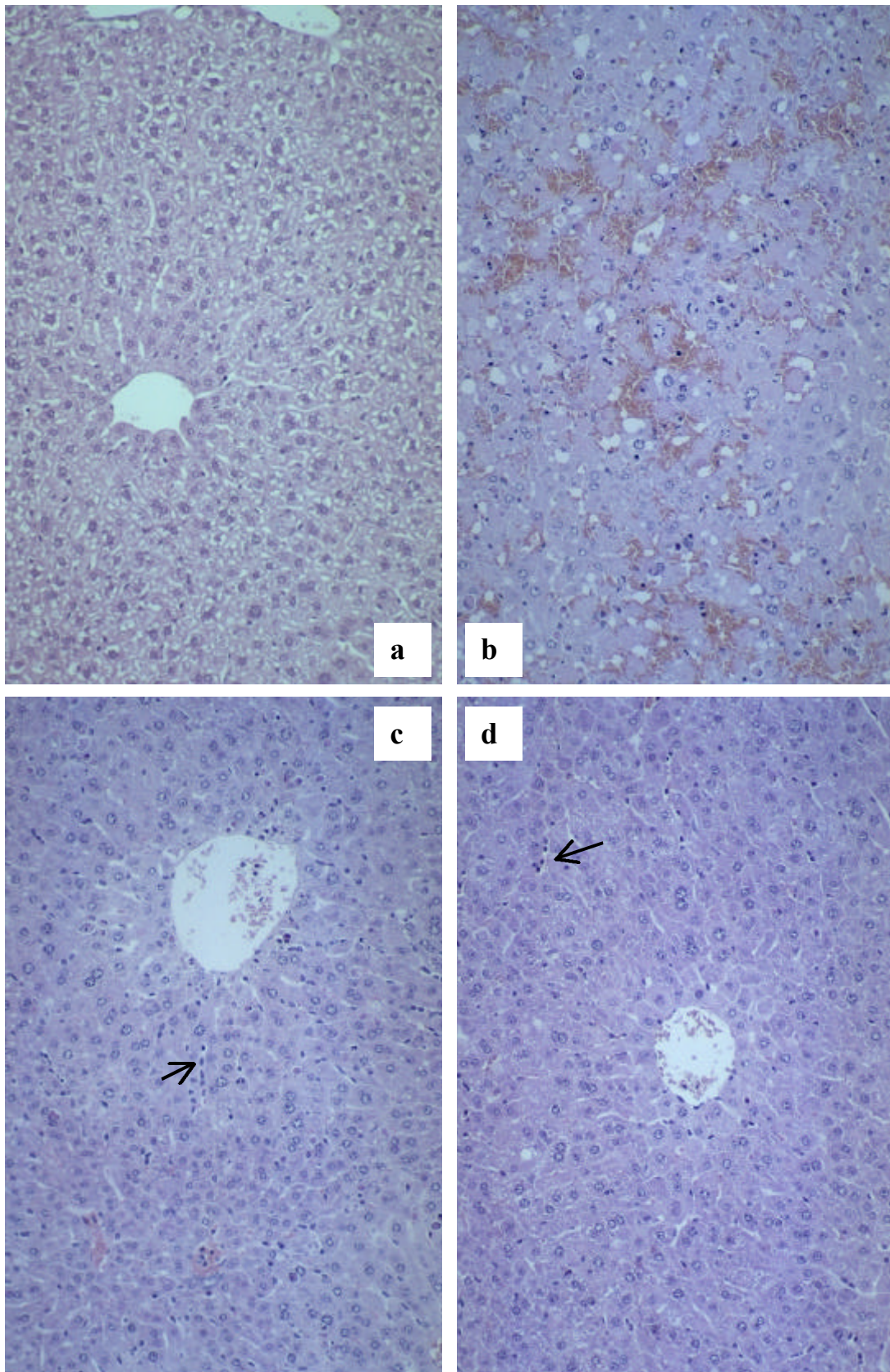


Abb. 4: Leber (H.E.) x 200

a) PBS-Kontrolle

c) Imexon 7 h Apoptosegrad 2-3

® Granulozyten-Sticking

b) LPS 7 h, Apoptosegrad 5, Nekroseggrad 2

d) Dexamethason 7 h

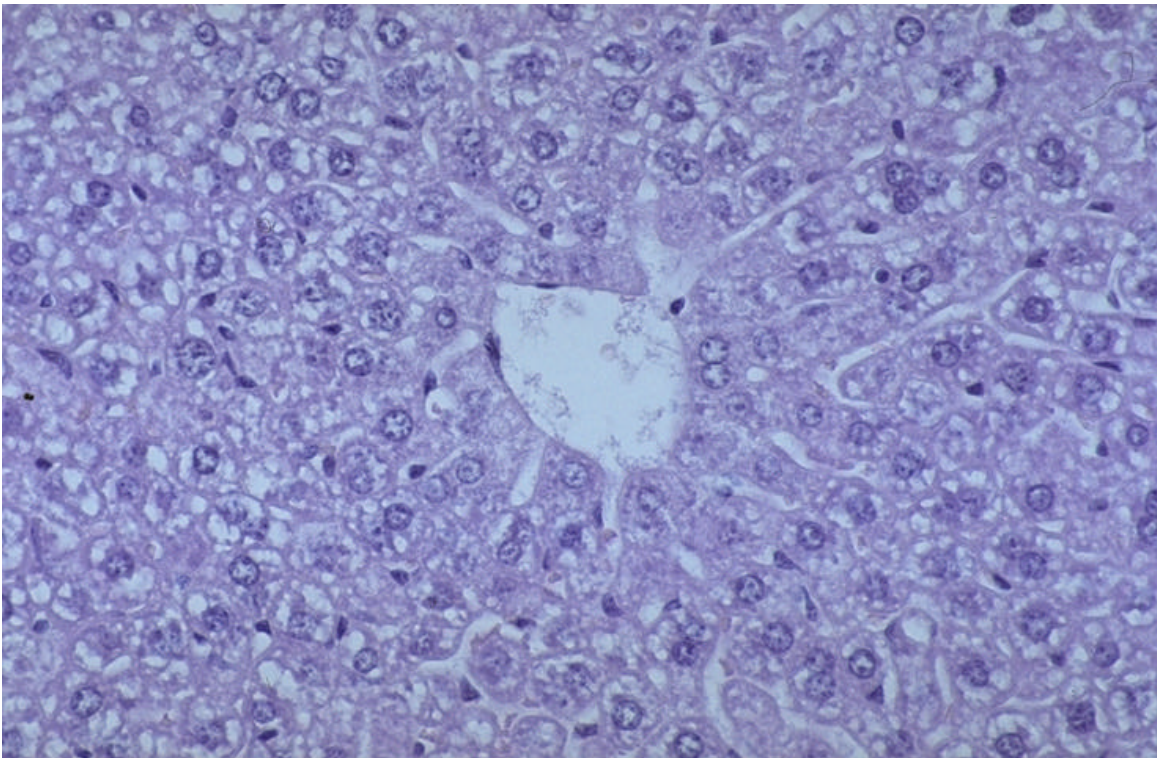


Abb. 5a: Leber (H.E.) x 400 PBS-Kontrolle

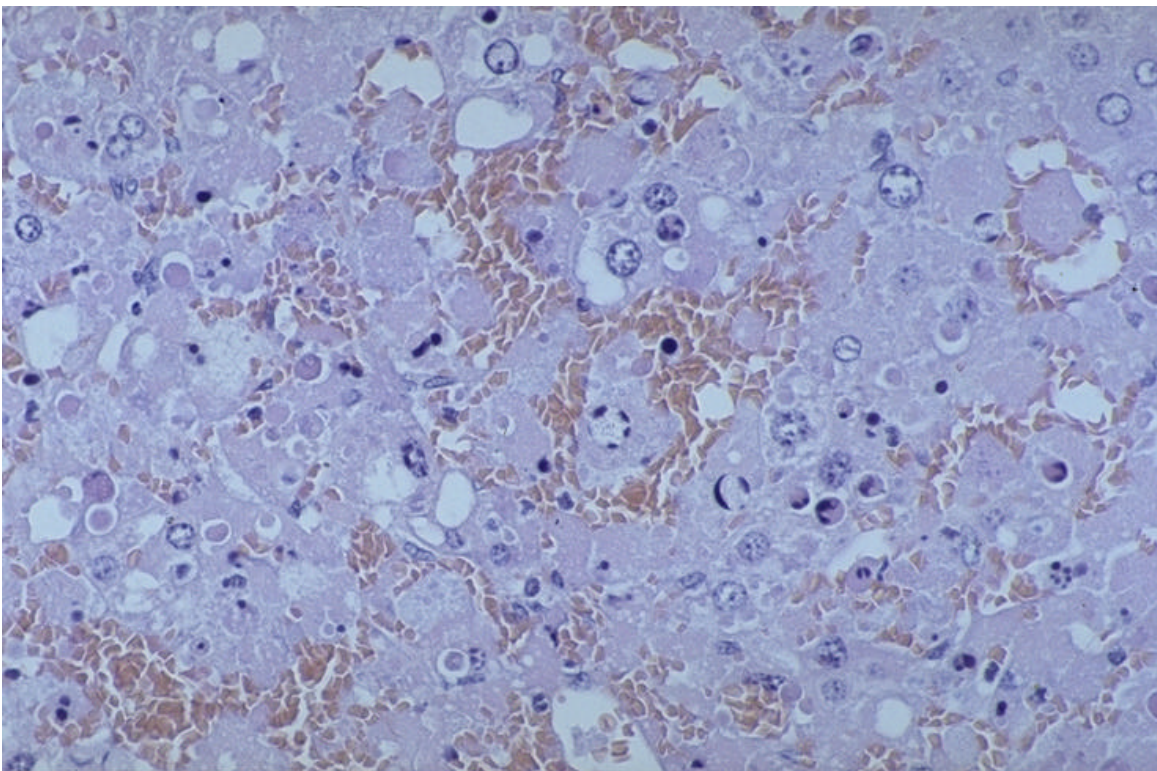


Abb. 5b: Leber (H.E.) x 400 LPS 7 h, Apoptosegrad 5, Nekroseggrad 2

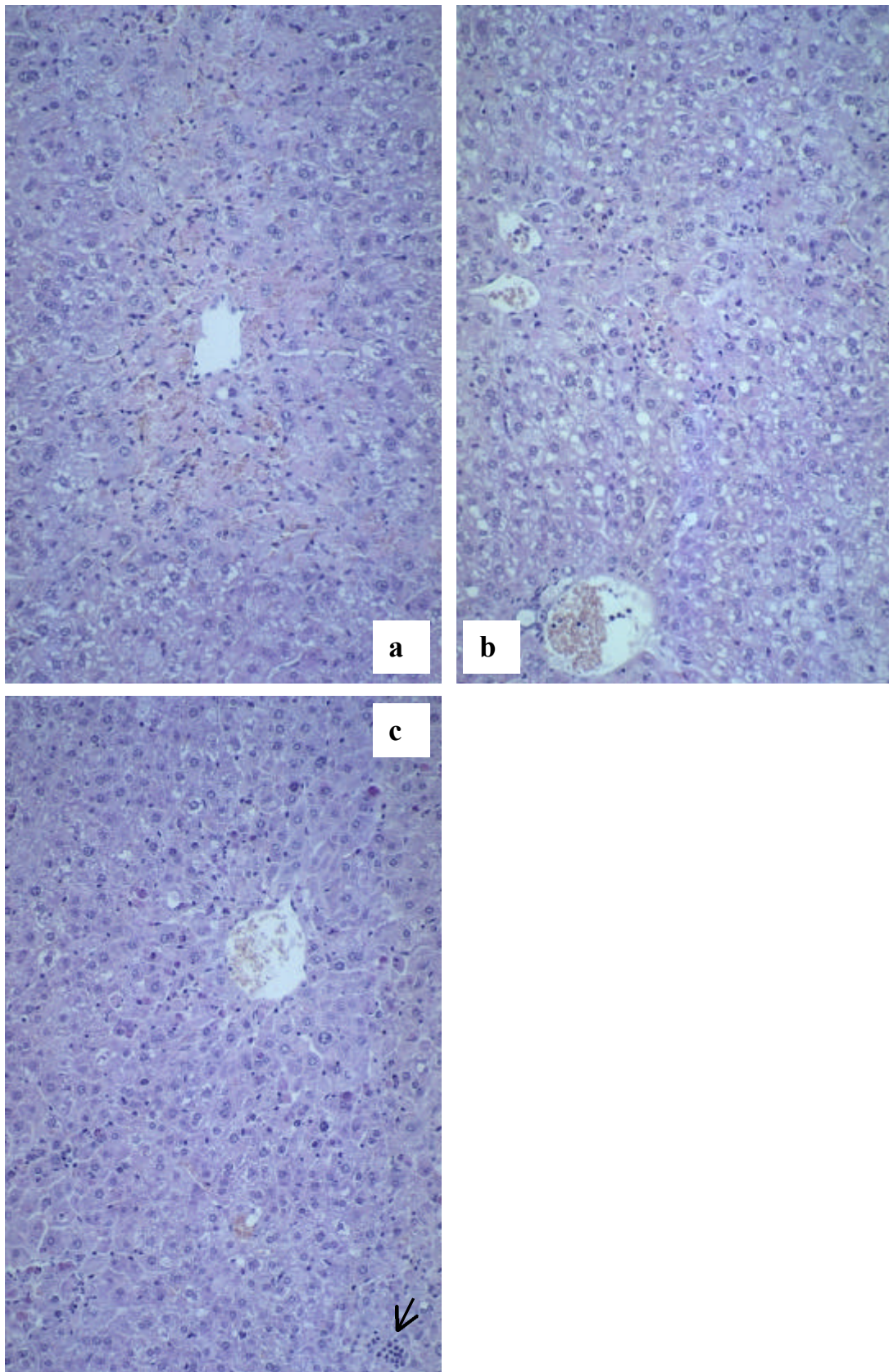


Abb. 6: Leber (H.E.) x 200

a) LPS 24 h Nekrosegrad 5

c) Dexamethason 24 h Apoptosegrad 3-4

® Granulozytennest um Einzelzellnekrose

b) Imexon 24 h Nekrosegrad 3

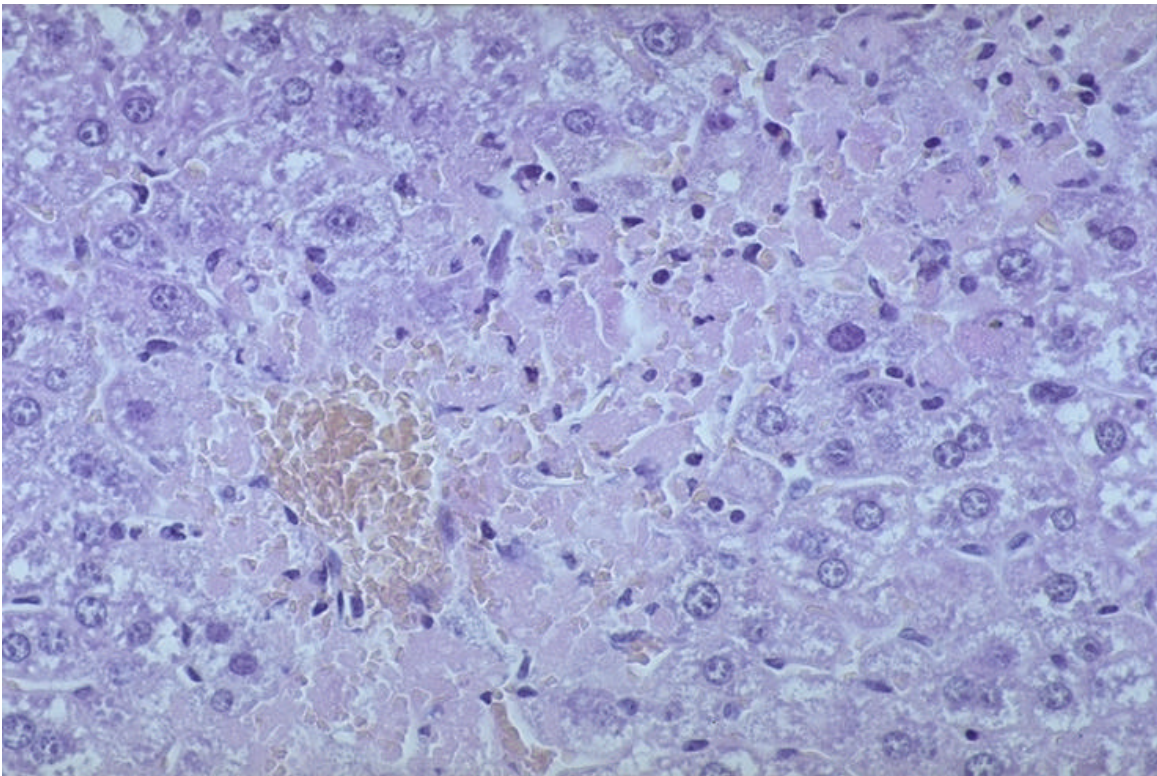


Abb. 7a: Leber (H.E.) x 400 LPS 24 h

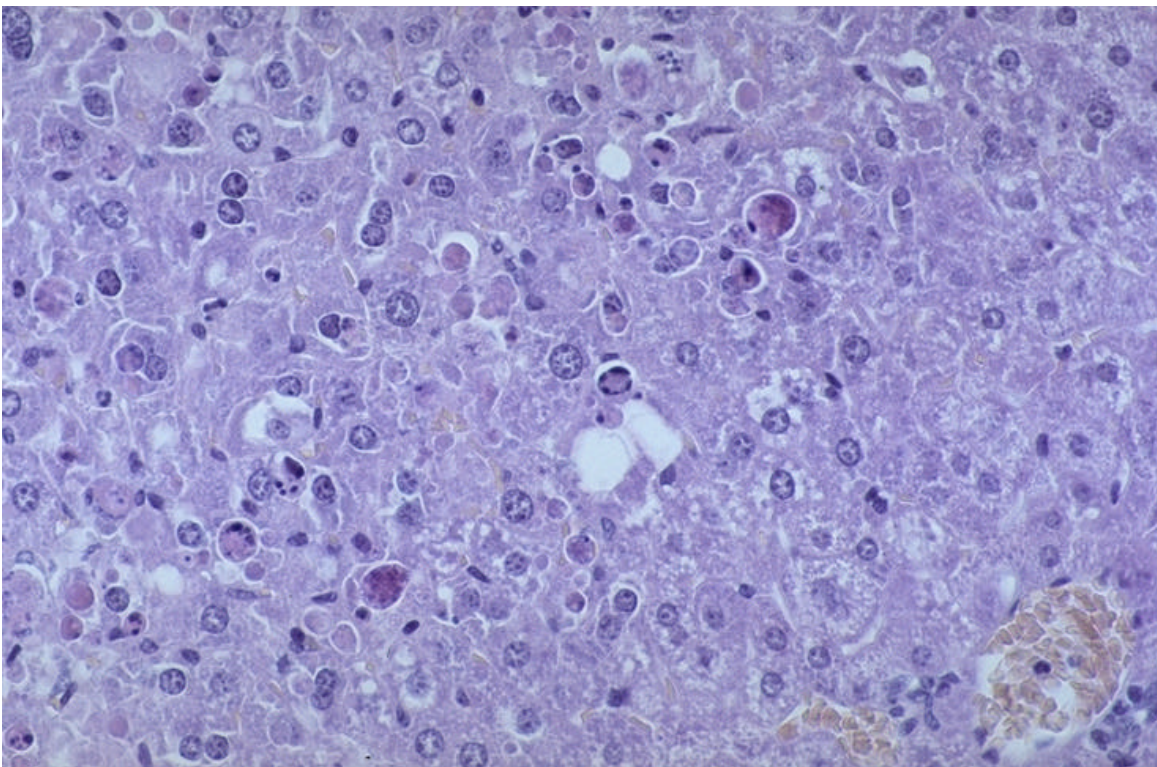


Abb. 7b: Leber (H.E.) x 400 Dexamethason 24 h

4.10 Immunhistologische Befunde der Leber

4.10.1 Makrophagen in der Leber

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers F4/80 sind neben Monozyten in der Leber die Kupfferzellen als Gewebsmakrophagen darstellbar. Sie zeigen eine starke braune Membran- und schwächere Zytoplasmafärbung.

4.10.1.1 Kontrollgruppen

Bei den Kontrolltieren erscheinen die Kupfferzellen als kleine, kräftig braune, schlanke bis vielgestaltige Zellen. Sie besitzen zahlreiche Zellfortsätze und sind im gesamten Gewebe in großer Zahl vorhanden (vgl. Abb. 8a).

4.10.1.2 Therapiegruppen

4.10.1.2.1 7 h-Gruppen

Bei den Tieren der LPS-Gruppe ist nach sieben Stunden die Gesamtzahl der Kupfferzellen nicht erkennbar verändert. Der überwiegende Teil der Zellen ist jedoch deutlich vergrößert und stark abgerundet. Die Zahl der angeschnittenen Zellausläufer ist deutlich reduziert. Die zytoplasmatische Färbung erscheint bei den meisten Zellen etwas granuliert. Im Zytoplasma vieler vergrößerter Kupfferzellen sind Zelltrümmer mit variabler Anfärbbarkeit zu erkennen (vgl. Tab. 23, Abb. 8b).

In der Imexon-Gruppe ist die Mehrzahl der Kupfferzellen vergrößert, aber weniger stark als bei den scheinbehandelten Tieren. Eine Ausnahme bilden einige stark vergrößerte Zellen mit perizentral bis intermediärer Lokalisation. Die Zellen sind nicht so stark abgerundet. Die Zahl der angeschnittenen Zellausläufer entspricht der in der Kontrollgruppe. Weniger Zellen lassen Anzeichen von Phagozytose erkennen. (vgl. Tab. 23, Abb. 8c).

In der Dexamethason-Gruppe sind die meisten Zellen kaum vergrößert und weichen auch in der Morphologie nur wenig von denen der Kontrolltiere ab. Stärker phagozytierende Zellen sind nur vereinzelt vorhanden (vgl. Tab. 23, Abb. 8d).

4.10.1.2.2 24 h-Gruppen

Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Kupfferzellen bei Tieren der LPS- und der Imexon-Gruppe in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation ein sehr variables Erscheinungsbild. Viele sehr große Zellen liegen im Bereich der Flächennekrosen. Ihre Expression ist besonders im Zytoplasma schwach. Um diese Bereiche herum befinden sich etwas weniger vergrößerte Zellen mit starker Anfärbung von Membran und Zytoplasma. Sie zeigen teilweise Anzeichen von Phagozytose. Zur Glissonschen Trias hin nehmen Zellgröße und Abrundung immer mehr ab. Die periportal gelegenen Zellen sind im Bereich ausgedehnter Nekrosen auch deutlich vergrößert, sonst eher klein und vielgestaltig. Die Zahl und Lokalisation der vergrößerten Zellen bei den einzelnen Tieren steht in Relation zum Ausmaß der nekrotischen Veränderungen (vgl. Tab. 24, Abb. 9a, Abb. 9b).

Unter dem Einfluss von Dexamethason zeigt sich auch bei der Beurteilung der F4/80⁺-Zellen eine Verschiebung im zeitlichen Auftreten der Veränderungen. Bei dieser Gruppe sind nach vierundzwanzig Stunden fast alle Kupfferzellen etwas vergrößert. In manchen stark vergrößerten Zellen ist phagozytiertes Material sichtbar. Die Anfärbbarkeit ist nicht reduziert und ein spezifisches Verteilungsmuster ist nicht erkennbar, außer bei einem Einzeltier mit kleinen nekrotischen Bereichen, bei dem sich sehr große, etwas schwächer gefärbte Zellen um die Nekroseherde formieren (vgl. Tab. 24, Abb. 9c).

4.10.2 Makrophagen und Granulozyten in der Leber

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MAC-1 können in der Leber zwei verschiedene Zellpopulationen dargestellt werden. Die Granulozyten zeigen eine leuchtend braune Membranreaktion. Sie sind durch ihre Morphologie und die kräftige Färbung gut von Zellen der Makrophagen-Monozytenlinie zu unterscheiden. Diese exprimieren das Antigen deutlich schwächer. Sie lassen eine blasse, leicht granulierte Anfärbung erkennen.

4.10.2.1 Kontrollgruppen

In der Leber der Kontrolltiere sind wenige Granulozyten gleichmäßig im gesamten Schnitt verteilt anzutreffen. Auch blass gefärbte Makrophagen sind, wie bei der Färbung mit dem Antikörper F4/80, im gesamten Gewebe vorhanden. Sie stellen sich als kleine, schlanke Zellen dar (vgl. Abb. 10a). Einige stärker reagierende Zellen sind im Bereich der Gallengänge und angrenzend an größere Portalgefäße vorhanden.

4.10.2.2 Therapiegruppen

4.10.2.2.1 7 h-Gruppen

Nach sieben Stunden ist die Zahl der Granulozyten in der LPS-Gruppe stark vermehrt. In manchen Bereichen bilden sie lockere Anhäufungen. In den Sinusoiden tritt sogenanntes Granulozyten-Sticking auf (vgl. Tab. 21, Abb. 10b). Bei den Kupfferzellen kommt es bei gleichbleibender Verteilung zur Vergrößerung der Einzelzelle. Die Expression des MAC-1-Antigens ist nur bei den Makrophagen leicht hochreguliert (vgl. Tab. 23, Abb. 10b).

Nach vorbeugender Behandlung mit Imexon ist die Granulozytenzahl im Durchschnitt noch etwas stärker angestiegen. Auch hier sind teilweise lockere Zellanhäufungen zu erkennen. Granulozyten-Sticking tritt in stärkerem Maße auf als bei den scheinbehandelten Tieren (vgl. Tab. 21, Abb. 10c). Die meisten Kupfferzellen erscheinen nur leicht vergrößert, zeigen aber eine deutlichere Hochregulierung der MAC-1-Expression als die in der LPS-Gruppe (vgl. Tab. 23, Abb. 10c).

Die Zahl der Granulozyten in der Dexamethason-Gruppe entspricht in der der LPS-Gruppe, wobei Granulozyten-Sticking auch gehäuft auftritt. Zellanhäufungen im Gewebe werden nicht beobachtet (vgl. Tab. 21, Abb. 10d). Eine Vergrößerung der Kupfferzellen ist nicht erkennbar, eine Hochregulierung des MAC-1-Antigens deutet sich bei den Makrophagen an (vgl. Tab. 23, Abb. 10d).

4.10.2.2.2 24 h-Gruppen

Vierundzwanzig Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS sind in der LPS- und der Imexon-Gruppe Granulozyten in großer Zahl in den stärker nekrotischen Bereichen konzentriert. Im umgebenden Lebergewebe sind kaum Granulozyten nachweisbar. Die Zellzahl korreliert mit der Ausdehnung der Nekrosen und ist folglich bei der Imexon-Gruppe im Durchschnitt weniger groß als bei der LPS-Gruppe (vgl. Tab. 22). In der Imexon-Gruppe lagern sich außerdem einige Granulozyten in kleinen Nestern eng um einzelne veränderte Zellen (vgl. Abb. 11a, b).

Das mit Dexamethason behandelte Tier, welches zusammenhängende Nekroseareale entwickelt hat, zeigt in den Nekrosen das gleiche histopathologische Bild wie die Tiere der LPS- und der Imexon-Gruppe. Bei den anderen Tieren ist die Granulozytenzahl nur geringgradig erhöht (vgl. Tab. 22). Es fallen aber vermehrt nestartige Granulozytenansammlungen um einzelne veränderte Zellen auf (vgl. Abb. 11c).

Bei den Kupfferzellen ist die MAC-1-Expression in allen Gruppen deutlich verstärkt. Bei den Tieren der LPS- und der Imexon-Gruppe sind die meisten Kupfferzellen etwas, die in den

nekrotischen Bereichen gelegenen jedoch extrem vergrößert und stark phagozytierend. Auch sie zeigen sehr starke MAC-1-Expression mit leicht granulierter zytoplasmatischer Anfärbung. Die periportal gelegenen Kupfferzellen sind dagegen kleiner (vgl. Tab. 24, Abb. 11a, Abb. 11b).

Bei der Dexamethason-Gruppe liegen gering bis stark vergrößerte Kupfferzellen gleichmäßig im gesamten Läppchengebiet verteilt. Die vergrößerten Zellen weisen deutliche Anzeichen von Phagozytose auf (vgl. Tab. 24, Abb. 11c).

Tab. 21: Granulozyten (MAC-1) der Leber (7 h-Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe ¹	Granulozytenzahl ²	Granulozyten- Sticking ³
Kontrollgruppe (3)	1	0
LPS-Gruppe (5)	3-4	1
Imexon-Gruppe (6)	4	1-2
Dexamethason- Gruppe (6)	3-4	2
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. ² Zahl der Granulozyten im gesamten Schnitt ³ Häufigkeit des Auftretens von Granulozyten-Sticking		

Tab. 22: Granulozyten (MAC-1) der Leber (24 h-Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe ¹	Granulozytenzahl ²	Granulozyten- Infiltration ³	Granulozyten- Ansammlung ⁴
Kontrollgruppe (3)	1	0	0
LPS-Gruppe (7)	5	4	0
Imexon-Gruppe (8)	3-4	2	1
Dexamethason- Gruppe (10)	2	0(-1 ^{3a})	2
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. ² Zahl der Granulozyten im gesamten Schnitt ³ Ausdehnung der Abräumreaktion in Nekrosegebieten ^{3a} nur bei einem Tier auftretend ⁴ Häufigkeit des Auftretens von Zellnestern			

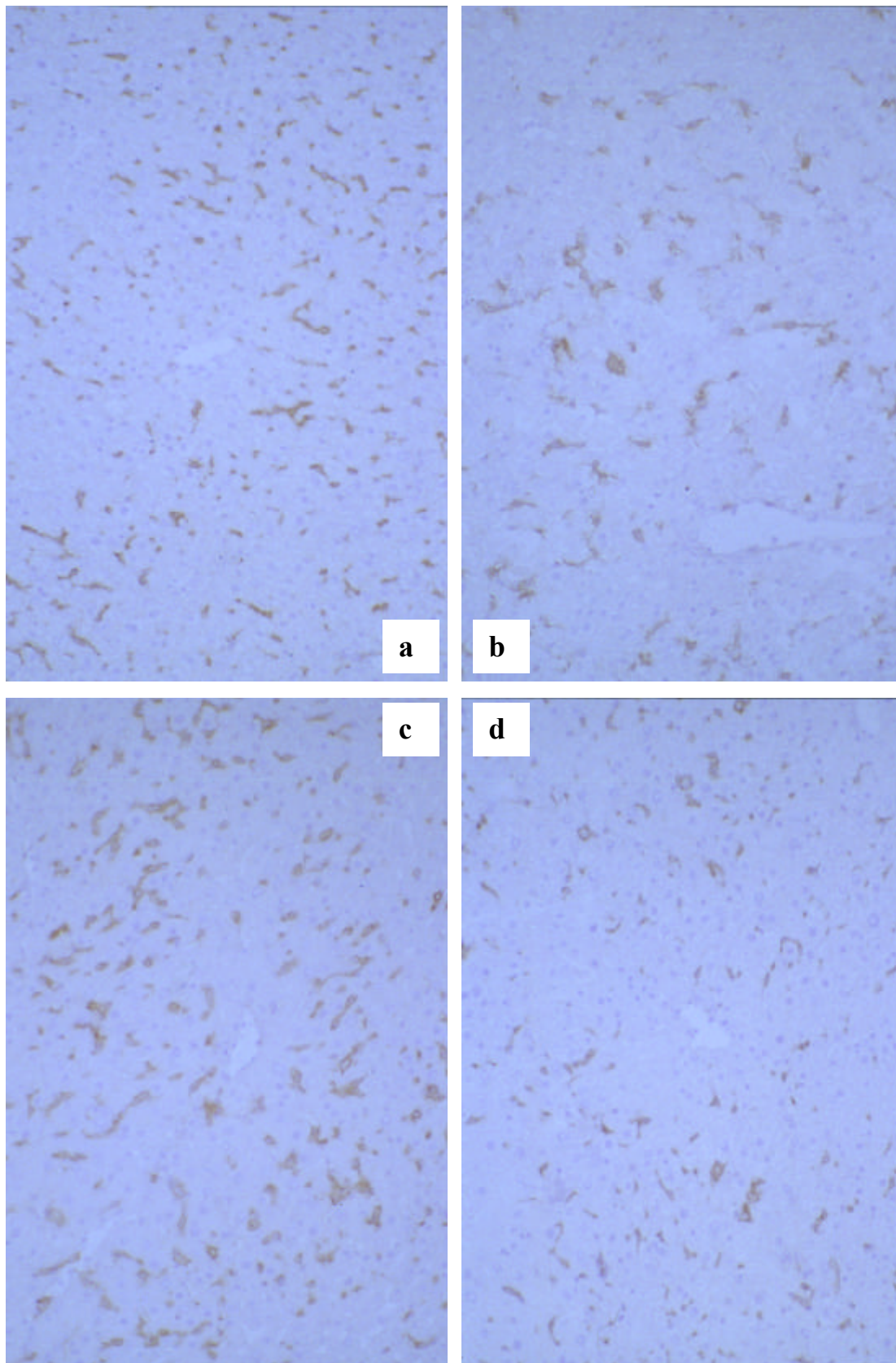


Abb. 8: Makrophagen in der Leber (F4/80) x 200

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

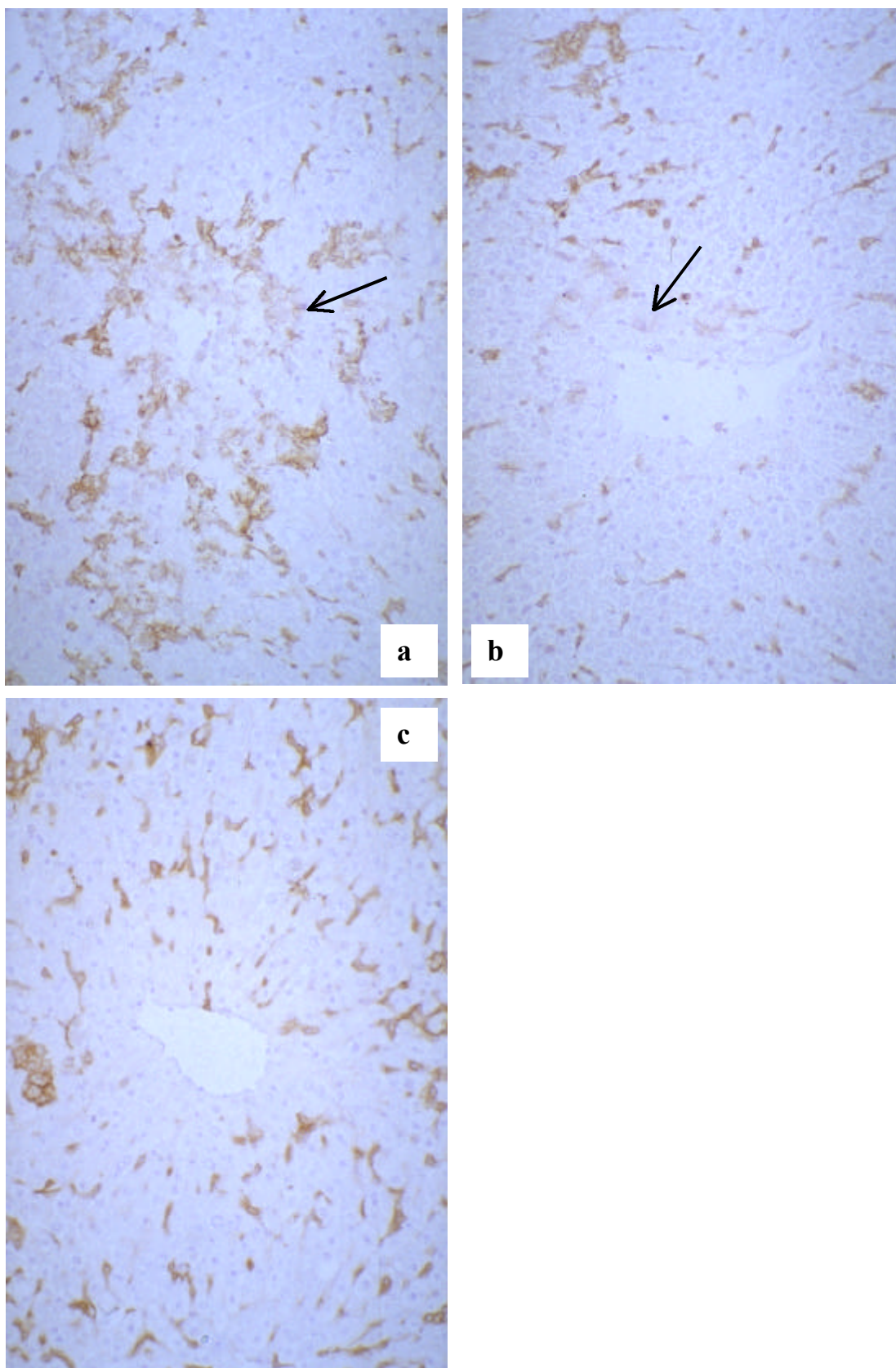


Abb. 9: Makrophagen in der Leber (F4/80) x 200 ® Nekrosen

a) LPS 24 h

b) Imexon 24 h

c) Dexamethason 24 h

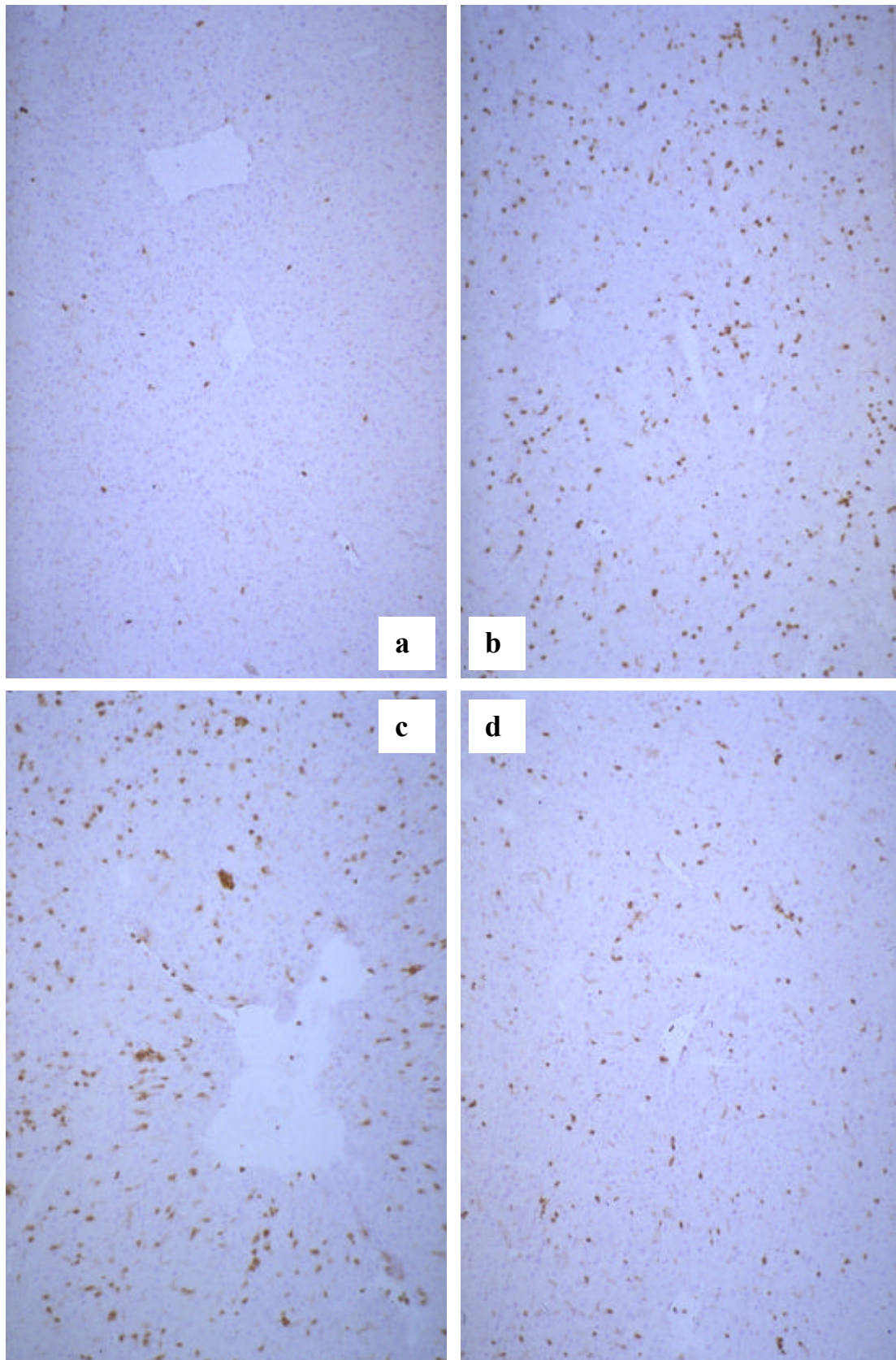


Abb. 10: Granulozyten und Makrophagen in der Leber (MAC-1) x 200

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

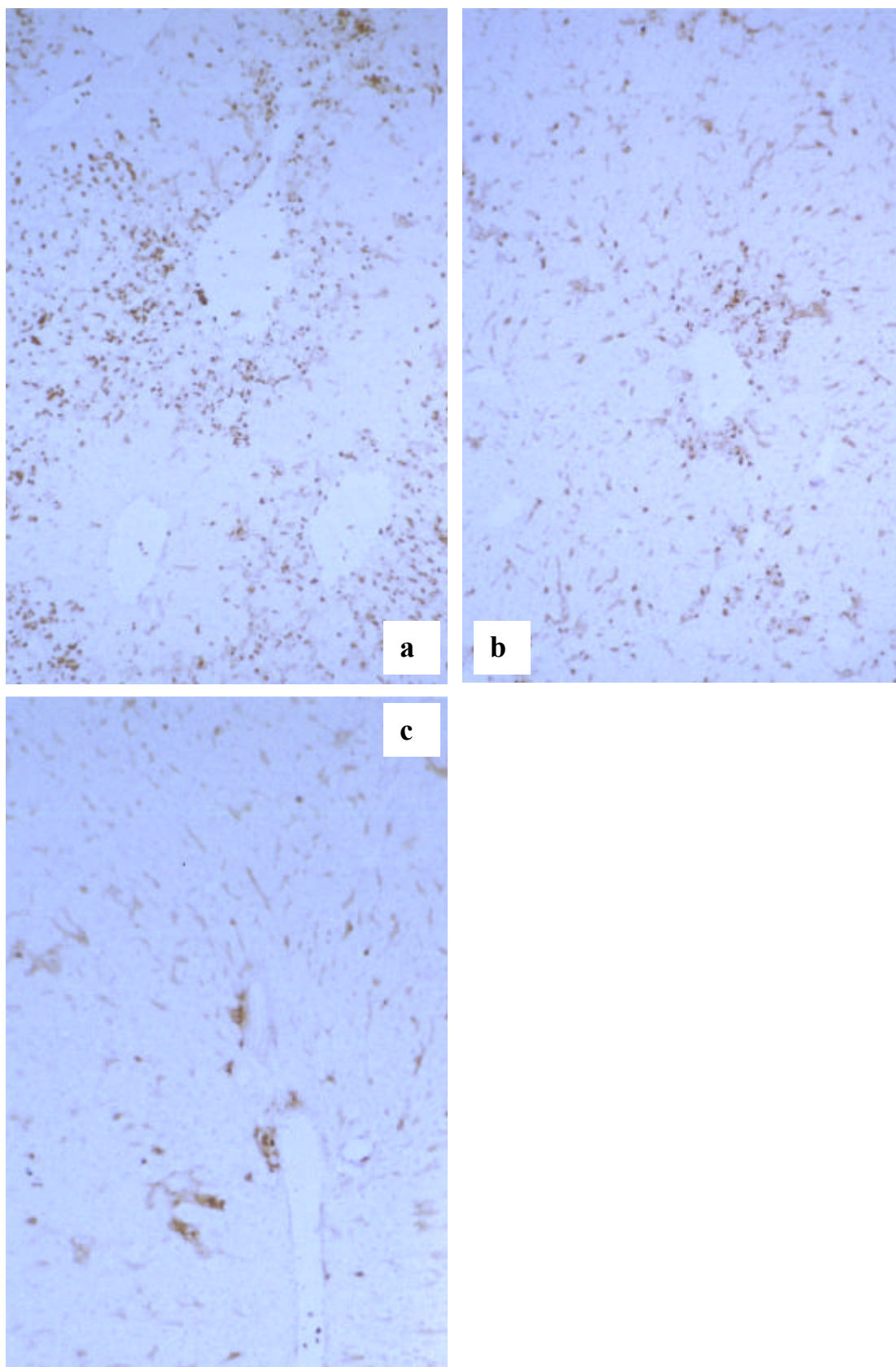


Abb. 11: Granulozyten und Makrophagen in der Leber (MAC-1) x 200

a) LPS 24 h

b) Imexon 24 h

c) Dexamethason 24 h

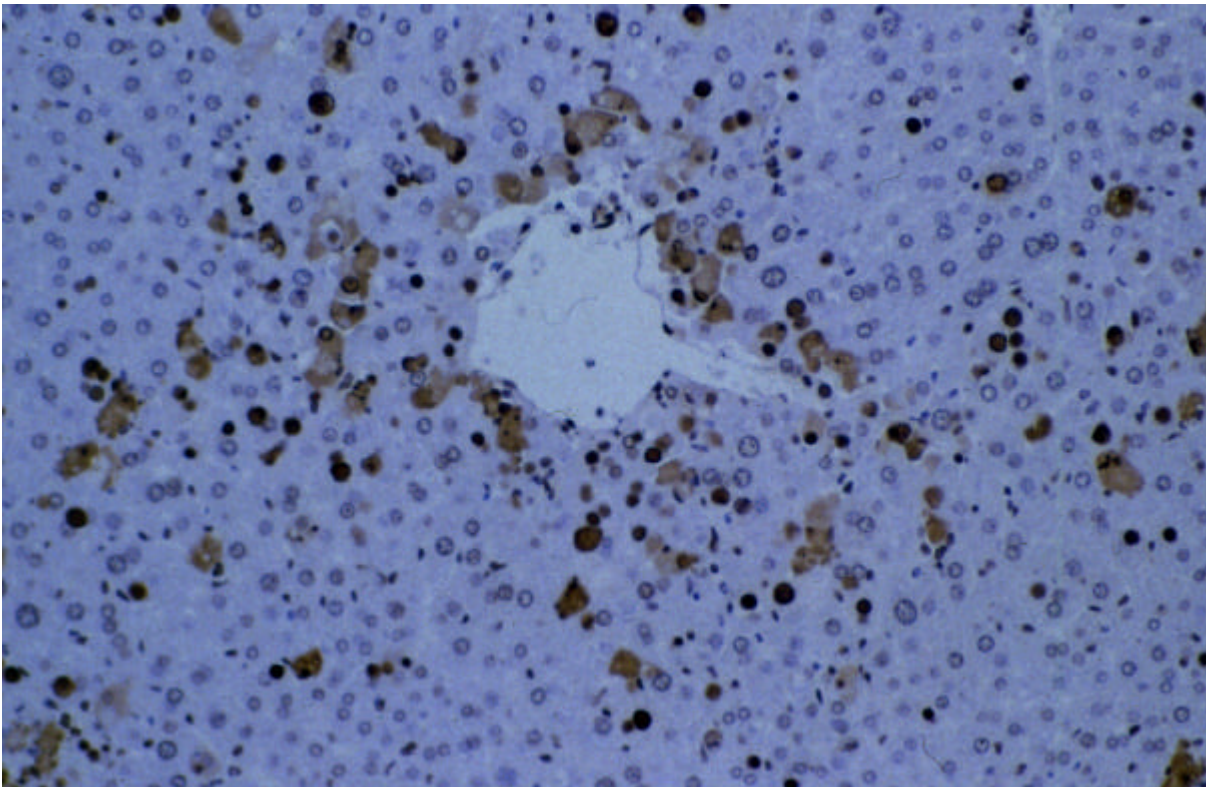


Abb. 12a: Leber (TUNEL) Apoptosen 7 h

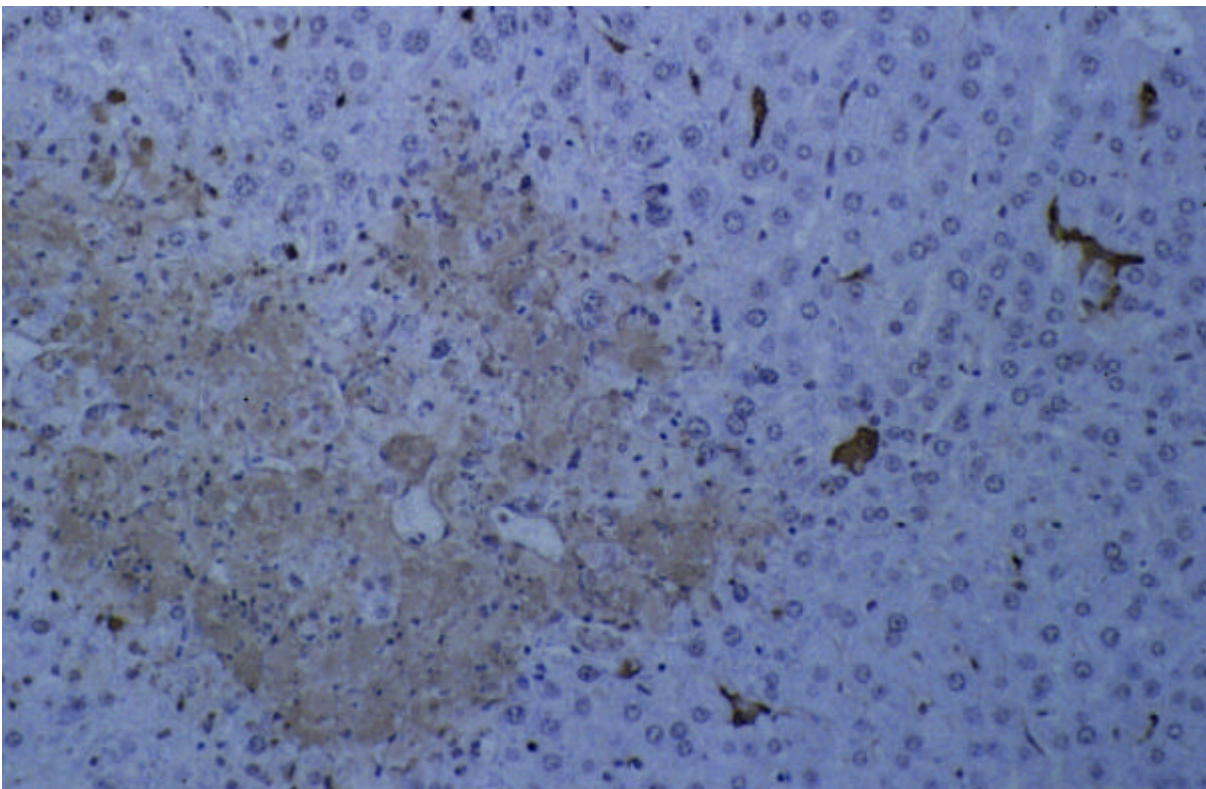


Abb. 12b: Leber (TUNEL) Nekrosen 24 h

4.11 TUNEL-Test in der Leber

Mit Hilfe des TUNEL-Tests (TdT-mediated dUTP nick end labeling) ist es möglich, die freien 3'-OH-Enden der DNA-Bruchstücke zu markieren, die bis auf wenige Ausnahmen im Verlauf des apoptotischen Zelltodes entstehen. Damit können Apoptosen in ihrer Lokalisation im Gewebe sichtbar gemacht werden. Die apoptotischen Kerne erscheinen hierbei als sehr kleine, tief dunkelbraune, runde Gebilde mit homogener Anfärbung oder als größere, heller braune, runde Strukturen mit dunkelbraunem Rand, bei denen zum Teil Chromatinmarginierung und Chromatinkondensation sichtbar sind. Nekrotische Zellen zeigen bisweilen ebenfalls eine, wenn auch sehr blasse, leicht bräunliche Anfärbung.

4.11.1 Kontrollgruppen

Bei den Tieren der Kontrollgruppen sind stärker braun gefärbte apoptotische Zellen nur sehr vereinzelt zu finden.

4.11.2 Therapiegruppen

4.11.2.1 7 h-Gruppen

Nach sieben Stunden sind in der Leber von Tieren der LPS-Gruppe zahlreiche apoptotische Hepatozyten zu erkennen. Apoptotische Körperchen werden meist innerhalb von anderen Hepatozyten angetroffen, die teilweise eine sehr blasse, unregelmäßige, leicht bräunliche Verfärbung aufweisen. Besonders gehäuft treten die apoptotischen Veränderungen in den Gebieten um die Zentralvene auf. Zur Läppchenperipherie hin nehmen sie an Zahl ab (vgl. Abb. 12a).

In der Imexon-Gruppe ist das Aufkommen an Apoptosen geringer als in der LPS-Gruppe. Sie sind auch hier überwiegend zentral bis intermediär zu finden.

Nach Behandlung mit Dexamethason sind nur bei einzelnen Tieren perizentral vermehrt apoptotische Zellen zu sehen.

4.11.2.2 24 h-Gruppen

Vierundzwanzig Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS sind sowohl in der LPS-Gruppe als auch unter dem Einfluss von Imexon kaum mehr Apoptosen sichtbar. Vereinzelt sind angefärbte Strukturen in und um die schwach bräunlichen, nekrotischen Gebiete zu erkennen (vgl. Abb. 12b).

In der Dexamethason-Gruppe hingegen ist zu diesem Zeitpunkt die Zahl der Apoptosen leicht, bei einzelnen Tieren sogar deutlich angestiegen. Die apoptotischen Gebilde sind auch hier vornehmlich perizentral lokalisiert.

4.12 Pathologisch-anatomische Befunde der Milz

Die Größe der Milz schwankt sowohl in den Kontroll- als auch in den Therapiegruppen stark. Nach sieben Stunden erscheint das Gewebe im Anschnitt bei den meisten Tieren der Therapiegruppen hochgradig blutgestaut.

Nach vierundzwanzig Stunden ist bei vielen Tieren der LPS- und der Imexon-Gruppe die Kongestion noch immer makroskopisch erkennbar. Bei der Dexamethason-Gruppe ist die Blutfülle in den meisten Fällen deutlich geringer. Vereinzelt entspricht der Anschnitt im Bild den Kontrolltieren.

4.13 Pathologisch-histologische Befunde in der Milz

4.13.1 Kontrollgruppen

Die Milz von Tieren der Kontrollgruppen ist ohne histopathologischen Befund. Wegen des geringen Blutgehaltes dominieren kernhaltige Zellen das Bild. Im Bereich der Germinalzentren fallen vereinzelt Veränderungen wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und -fragmentierung sowie stärker eosinophile hyaline Zellreste auf, die als Apoptosen angesprochen werden.

4.13.2 Vergleichsgruppen für die isolierte Applikation von GalN bzw. LPS

Nach Verabreichung von GalN ohne LPS sind in der Milz sowohl nach sieben als auch nach vierundzwanzig Stunden keinerlei Abweichung vom histologischen Bild der Kontrolltiere erkennbar.

Bei Stimulation mit LPS alleine ist die Milz nach sieben Stunden stark blutgefüllt. Das Bild in der roten Pulpa wird von erweiterten Sinusoiden dominiert. Die Zahl der Lymphozyten ist gegenüber den Kontrollgruppen erheblich reduziert. Die Lymphozyten der Marginalzone sind bis auf Einzelzellen gänzlich verschwunden. In der PALS ist ihre Zahl deutlich reduziert.

Vierundzwanzig Stunden nach alleiniger Verabreichung von LPS ist die rote Pulpa geringgradig zellreicher als nach sieben Stunden und noch immer etwas vermehrt blutgefüllt. Die

Lymphozyten in der Marginalzone sind zahlenmäßig reduziert, wodurch der Saum, der die weiße Pulpa umgibt, noch immer schmaler erscheint als bei den Kontrolltieren. In den Follikeln ist keine Veränderung sichtbar. In der PALS hingegen kommt es zu unterschiedlich starken Auflockerungserscheinungen. Die Zellzahl ist deutlich reduziert.

4.13.3 Therapiegruppen

4.13.3.1 7 h-Gruppen

Sieben Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS ist die Milz bei den Tieren aller Gruppen stark blutgefüllt. Die Sinusoide erscheinen erweitert. Auch zwischen den Zellen der Pulpastränge und im Bereich des Marginalsinus sind Erythrozyten zu finden. Die Zahl der Lymphozyten in der roten Pulpa ist deutlich reduziert.

Die Tiere der LPS-Gruppe weisen in der Marginalzone eine hochgradige Depletion der Lymphozytenpopulation auf. Einzelzellen sind nur noch im Randbereich zu Follikeln und PALS zu finden. In den Follikeln ist die Zelldichte unverändert. Auffällig aber ist die starke Zunahme apoptotisch veränderter Zellen, die jetzt als ganze Zellgruppen in den meisten Follikeln zu finden sind. In der PALS tritt bei der Mehrzahl der Tiere eine starke Depletion im mittleren bis inneren Bereich auf. Vereinzelte apoptotische Zellen sind nun auch um die Zentralarterie sichtbar.

Bei den mit Imexon behandelten Tieren ist die Depletion der Marginalzone geringer ausgeprägt. Die Lymphozyten bilden verstreut liegend einen schmalen Saum um PALS und Follikel. Letztere weisen vergleichbare Veränderungen auf wie in der LPS-Gruppe. Die Depletion der PALS ist bei starker Streuung der individuellen Befunde im Mittel weniger ausgeprägt. Apoptosen sind auch hier im T-Zellbereich vorhanden. Außerdem fällt in der roten Pulpa eine Zunahme der Granulozyten auf.

Die Dexamethason-Gruppe zeigt in der Marginalzone ein Bild, das dem der Imexon-Gruppe entspricht. Die Apoptoseinzidenz ist sowohl im Follikel als auch in der PALS hochgradig verstärkt. Die Depletion der PALS ist allerdings weniger stark ausgeprägt als in den beiden anderen Gruppen. Auch hier sind die Granulozyten v.a. in den sinusoidalen Bereichen um die Marginalzone vermehrt.

4.13.3.2 24 h-Gruppen

Nach vierundzwanzig Stunden haben sich die Veränderungen in der Milz bei den Tieren der LPS-Gruppe nur wenig zurückgebildet. Die rote Pulpa ist noch immer etwas vermehrt blutgefüllt; die Anzahl kernhaltiger Zellen ist deutlich reduziert, sie hat aber gegenüber den 7 h-Gruppen wieder zugenommen. Die Lymphozyten in der Marginalzone haben im Vergleich zu den 7 h-Gruppen etwas an Zahl zugenommen, so dass sie als schmaler Saum Follikel und PALS von der roten Pulpa trennen. In der PALS ist eine deutliche Zunahme der Zelldichte zu vermerken. Apoptosen sind in Follikel und PALS nur ganz vereinzelt vorhanden.

Bei der Imexon-Gruppe ist in der roten Pulpa und der Marginalzone eine deutlichere Lymphozytenrepopulation als in der LPS-Gruppe erkennbar. Die Anzahl der Lymphozyten in der Marginalzone und damit ihre Breite schwankt stark auch zwischen verschiedenen Bereichen in der Milz ein und desselben Tieres. Die Zelldichte in der PALS ist mit der der Kontrollgruppe vergleichbar. Die Apoptosehäufigkeit ist nur innerhalb der Follikel noch leicht erhöht.

In der Dexamethason-Gruppe ist die Blutfülle zu diesem Zeitpunkt deutlich zurückgegangen. Die Verteilung der Lymphozyten in allen Kompartimenten entspricht in etwa der der Kontrolltiere. Apoptosen sind nur ganz vereinzelt vorhanden.

4.14 Immunhistologische Befunde der Milz

4.14.1 T-Lymphozyten in der Milz

4.14.1.1 T-Gesamt-Zellpopulation

Die T-Gesamt-Lymphozytenpopulation wird mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Thy-1.2 dargestellt. Die markierten Zellen zeigen eine deutlich braune Membranfärbung.

4.14.1.1.1 Kontrollgruppen

Bei den Kontrolltieren sind T-Lymphozyten in allen Bereichen der Milz anzutreffen, vor allem jedoch in der PALS, dem spezifischen T-Zellgebiet, wo sie, sich von der Zentralarterie her ausbreitend, dicht gepackt liegen. Nur der äußerste Saum der PALS weist eine geringere Zelldichte auf und erscheint dadurch etwas aufgelockert. Die direkt benachbarten B-Zellfollikel beherbergen nur einzelne meist matt gefärbte Zellen. In der Marginalzone ist demgegenüber

eine leichte Zellkonzentrierung sichtbar. Dadurch hebt sich diese von der sie umgebenden roten Pulpa ab. Die zahlreichen Thy-1.2⁺-Zellen, die in der roten Pulpa lokalisiert sind, weisen, abgesehen von kleinen Zellanhäufungen um die terminalen Arteriolen, kein spezifisches Verteilungsmuster auf (vgl. Abb. 13a).

4.14.1.1.2 Therapiegruppen

4.14.1.1.2.1 7 h-Gruppen

Bei Tieren der LPS-Gruppe zeigt die PALS nach sieben Stunden mit Ausnahme der Bereiche angrenzend an die Marginalzone und um die Zentralarterie eine gegenüber den Kontrollen verminderte Zelldichte, in ihrer Flächenausdehnung hingegen ist gegenüber den Kontrolltieren keine Veränderung zu erkennen. Die Marginalzone erfährt bei der Mehrzahl der Tiere eine fast vollständige Depletion, die rote Pulpa ebenso (vgl. Tab. 25, Abb. 13b). Nur um die Terminalarteriolen verbleiben T-Lymphozyten in unverminderter Zahl.

Bei den Tieren der Imexon-Gruppe ist die PALS bei manchen Tieren kaum und im Durchschnitt aber geringer entspeichert als in der LPS-Gruppe. Die Veränderungen in Marginalzone und roter Pulpa hingegen entsprechen denen bei Tieren der LPS-Gruppe (vgl. Abb. 13c).

Bei Tieren, die mit Dexamethason behandelt wurden, ist die Verminderung der T-Zellen in der PALS kaum weniger stark ausgeprägt als bei den scheinbehandelten Tieren. Von der Depletion sind hier teilweise auch die äußeren und inneren Bereiche der PALS um die Zentralarterie betroffen, d.h. die Auflockerungserscheinungen sind flächiger verteilt, was einen quantitativen Vergleich mit den anderen Gruppen erschwert. Die Veränderungen in Marginalzone und roter Pulpa entsprechen denen der LPS-Gruppe (vgl. Tab. 25, Abb. 13d).

4.14.1.1.2.2 24 h-Gruppen

Nach vierundzwanzig Stunden sind in der LPS-Gruppe die T-Lymphozyten der PALS in geringerem Maße als nach sieben Stunden und bei manchen Tieren kaum noch reduziert (vgl. Tab. 25, Abb. 14a). In der Marginalzone und der roten Pulpa ist bei ca. der Hälfte der Tiere eine nur leichte, bei den anderen eine deutliche Zunahme an Zellen zu verzeichnen.

Bei der Imexon-Gruppe ist die Zellzahl in der PALS nur bei Einzeltieren verringert. Auch die Marginalzone enthält hier bei viel mehr Tieren eine ansehnliche Zahl Zellen. In der roten Pulpa ist bei der Zunahme der Zellen im Mittel kein Unterschied zu der Situation bei der LPS-Gruppe zu erkennen (vgl. Tab. 25, Abb. 14b).

In der Dexamethason-Gruppe ist bezüglich der Zelldichte in allen Bereichen der Milz, d.h. auch in der PALS, nur bei Einzeltieren eine geringe Abweichung von den Kontrolltieren vorhanden (vgl. Abb. 14c).

Tab. 25: T-Gesamt-Zellpopulation (Thy-1.2) der Milz

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe¹	Rote Pulpa²	Marginalzone²	PALS²
Kontrollgruppe 7 h (3)	3	3	5
LPS-Gruppe 7 h (5)	1	1	3
Imexon-Gruppe 7 h (6)	1	1	4
Dexamethason-Gruppe 7 h (6)	1	1	3(-4)
Kontrollgruppe 24 h (3)	3	3	5
LPS-Gruppe 24 h (7)	2	1-2	3-4
Imexon-Gruppe 24 h (8)	2	2	4-5
Dexamethason-Gruppe 24 h (10)	2-3	2-3	4-5
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. ² Zahlenwerte entsprechen der Zelldichte: von 1 = vereinzelte Zellen bis 5 = dicht gedrängt (vgl. Kap. 3.6.6)			

4.14.1.2 T-Helferzellen

Die Subpopulation der T-Helferzellen wird mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers L3T4 dargestellt. Er markiert die Zellen durch Bindung an das Oberflächenantigen (CD4) ebenfalls mit brauner Membranfärbung.

4.14.1.2.1 Kontrollgruppen

Auch T-Helferzellen sind in allen Gebieten der Milz zu finden. In der PALS liegen sie dicht. Aber selbst um die Zentralarterie, dem Gebiet der höchsten T-Zellkonzentration sind Zwischenräume zwischen den Zellen vorhanden. Die Follikel beherbergen einzelne Zellen, die

sich in ihrer Zahl nicht von den mit Thy-1.2 markierten unterscheiden. Die Marginalzone zeigt eine nur geringe Konzentrierung von $CD4^+$ -Zellen gegenüber der roten Pulpa, wo sich ebenfalls vermehrt Zellen um die Terminalarteriolen gruppieren. Das Bild erscheint zellärmer als bei Färbung mit dem T-Gesamt-Zellmarker.

4.14.1.2.2 Therapiegruppen

4.14.1.2.2.1 7 h-Gruppen

Nach sieben Stunden ist in der PALS der scheinbehandelten Tiere die Anzahl der T-Helferzellen v.a. in der inneren PALS deutlich reduziert. Die Marginalzone ist bei allen Tieren vollständig entspeichert. Auch in der roten Pulpa befinden sich kaum noch gefärbte Zellen (vgl. Tab. 26). Die Zellen um die Terminalarteriolen bleiben aber auch hier erhalten.

In der Imexon-Gruppe tritt eine deutliche Depletion der PALS nur bei manchen Tieren auf. In der Marginalzone und in der roten Pulpa sind kaum mehr Zellen zu finden als in der LPS-Gruppe (vgl. Tab. 26).

Nach Behandlung mit Dexamethason ist die Zelldichte in der PALS auch reduziert, allerdings etwas weniger als in der LPS-Gruppe. Von der Depletion sind hier auch die äußeren Bereiche der PALS betroffen. In roter Pulpa und Marginalzone entspricht das Bild dem der Imexon-Gruppe (vgl. Tab. 26).

4.14.1.2.2.2 24 h-Gruppen

Der Gehalt an T-Helferzellen in der roten Pulpa hat sich nach vierundzwanzig Stunden bei allen Tieren weitgehend normalisiert (vgl. Tab. 26).

In der LPS-Gruppe ist die PALS nur noch geringgradig entspeichert. In der Marginalzone hat die Zellzahl allerdings nur bei einigen Tieren wieder etwas zugenommen.

Bei Behandlung mit Imexon hat die PALS zu diesem Zeitpunkt eine Zelldichte wie bei den Kontrolltieren bis auf wenige Ausnahmen wieder erreicht. Auch in der Marginalzone hat eine deutliche Repopulation stattgefunden (vgl. Tab. 26).

In der Dexamethason-Gruppe gleicht die Zelldichte in der PALS der der LPS-Gruppe. Die Marginalzone zeigt bis auf wenige Ausnahmen die bei den Kontrolltieren beschriebene leichte Konzentrierung von Zellen (vgl. Tab. 26).

Tab. 26: T-Helferzellpopulation (L3T4) der Milz

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe ¹	Rote Pulpa ²	Marginalzone ²	PALS ²
Kontrollgruppe 7 h (3)	2	3	4-5
LPS-Gruppe 7 h (5)	1	1	2
Imexon-Gruppe 7 h (6)	1	1	3
Dexamethason-Gruppe 7 h (6)	1	1	2-3
Kontrollgruppe 24 h (3)	2	3	4-5
LPS-Gruppe 24 h (7)	2	1	3-4
Imexon-Gruppe 24 h (8)	2	2	4
Dexamethason-Gruppe 24 h (10)	2	2-3	3-4
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. ² Zahlenwerte entsprechen der Zelldichte: von 1 = vereinzelte Zellen bis 5 = dicht gedrängt (vgl. Kap. 3.6.6)			

4.14.1.3 Zytotoxische und T-Suppressorzellen

Die Subpopulation der zytotoxischen und T-Suppressorzellen wird mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Lyt-2 dargestellt. Er bindet an das Oberflächenantigen CD8 α . Alle markierten Zellen zeigen eine dunkelbraune, sehr deutliche Membranfärbung.

4.14.1.3.1 Kontrollgruppen

Die Mehrheit der zytotoxischen und T-Suppressorzellen ist in der PALS lokalisiert. Sie liegen hier in mäßiger Dichte, die bei den verschiedenen Tieren stärkeren Schwankungen unterliegt, und zeigen eine gleichmäßige Verteilung. Eine Konzentrierung im zentralen Bereich ist nur in Einzelfällen erkennbar. Die Follikel sind weitgehend frei von CD8 α ⁺-Lymphozyten. Eine ansehnliche Zahl markierter Zellen verteilt sich in Marginalzone und roter Pulpa ohne spezifische Konzentrierungen (vgl. Abb. 15a).

4.14.1.3.2 Therapiegruppen

4.14.1.3.2.1 7 h-Gruppen

Bei den 7 h-Gruppen kommt es bei Darstellung der CD8 α^+ -Zellen, im Unterschied zu den anderen T-Zellpopulationen, in der PALS und verstärkt um die Zentralarterie zu einer Zunahme der Zellkonzentration. Sie zeigt sich bei allen mit Ausnahme einiger mit Dexamethason behandelten Tiere und tritt so, trotz der Schwankungen innerhalb der Kontrollgruppe, deutlich zutage (vgl. Tab. 27, Abb.15b - 15d). Die Depletion in roter Pulpa und Marginalzone ist vergleichbar mit der bei anderen T-Zellpopulationen.

4.14.1.3.2.2 24 h-Gruppen

Vierundzwanzig Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS sind die CD8 α^+ -Zellen in der PALS nur bei Einzeltieren der LPS- und Imexon-Gruppe noch etwas vermehrt. Eine einheitliche Tendenz wie bei den 7 h-Gruppen ist nicht zu erkennen. Die Zunahme der Zellzahl in Marginalzone und roter Pulpa gegenüber den 7 h-Gruppen ist bei den Tieren der LPS- und Imexon-Gruppe mittelgradig, in der Dexamethason-Gruppe stark ausgeprägt (vgl. Tab. 27).

Tab. 27: Population der zytotoxischen und T-Suppressorzellen (Lyt-2) der Milz

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe ¹	Rote Pulpa ²	Marginalzone ²	PALS ²
Kontrollgruppe 7 h (3)	2	2	2-3
LPS-Gruppe 7 h (5)	1	1	3-4
Imexon-Gruppe 7 h (6)	1	1	3-4
Dexamethason-Gruppe 7 h (6)	1	1	3
Kontrollgruppe 24 h (3)	2	2	2-3
LPS-Gruppe 24 h (7)	1-2	1-2	3
Imexon-Gruppe 24 h (8)	1-2	1-2	3
Dexamethason-Gruppe 24 h (10)	2	2	2-3
¹ Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. ² Zahlenwerte entsprechen der Zelldichte: von 1 = vereinzelte Zellen bis 5 = dicht gedrängt (vgl. Kap. 3.6.6)			

4.14.1.4 Subpopulation der zytotoxischen und T-Suppressorzellen

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ly-3.2 wird eine Subpopulation der zytotoxischen und T-Suppressorzellen dargestellt. Der Antikörper bindet an das Oberflächenantigen CD8 β , das auf Mitogen-stimulierten, nicht im Thymus gereiften zytotoxischen und T-Suppressorzellen fehlt. Auch hier entsteht eine bräunliche Membranfärbung. Die Intensität der Anfärbbarkeit fällt innerhalb ein und desselben Färbedurchganges sehr unterschiedlich aus. Ohne Einfluss der Gruppenzugehörigkeit kommt es bei fünf Tieren zu einer nur mit Mühe erkennbaren, bei elf weiteren Tieren zu einer sehr schwachen Anfärbung (vgl. Tab. 28). Auch eine Wiederholungsfärbung der Milzschnitte von betroffenen Tiere ändert an diesem Ergebnis nichts. Die erreichte Farbeintensität lässt aber eine Bewertung der Verteilung der CD8 β^+ -Zellen zu.

4.14.1.4.1 Kontrollgruppen

In den Kontrollgruppen ist der größte Teil der markierten Zellen in der PALS lokalisiert. Die Zelldichte ist in den meisten Fällen mäßig. Bei einzelnen Tieren kommt es zu einer erkennbaren Konzentrierung in der inneren PALS. Die Streuung in der Zelldichte in diesem Bereich ist größer als bei der Reaktion mit Lyt-2. Die Follikel beherbergen fast keine Ly-3.2 $^+$ -Zellen. In Marginalzone und roter Pulpa findet sich eine ansehnliche Zahl markierter Zellen ohne spezifisches Verteilungsmuster.

4.14.1.4.2 Therapiegruppen

In der PALS tritt zu keinem Zeitpunkt eine einheitliche Entwicklung der Veränderungen auf. Die Streuung reicht von geringer Zelldichte bis hin zu einer deutlichen, die der Kontrolltiere übertreffenden Verdichtung in der gesamten PALS nach sieben Stunden.

In Marginalzone und roter Pulpa zeigt sich nach sieben Stunden bei allen Tieren eine Depletion, nach vierundzwanzig Stunden hat die Zellzahl wieder zugenommen.

Tab. 28: Anzahl der Tiere mit minimaler bzw. schwacher Reaktion mit Ly-3.2 je Gruppe

Anfärbbarkeit	Kontrolle 7 h	LPS 7 h	Imexon 7 h	Dexa- methason 7 h	Kontrolle 24 h	LPS 24 h	Imexon 24 h	Dexa- methason 24 h
Minimal	0	1	0	0	1	1	2	0
Schwach	1	1	0	2	0	4	1	2

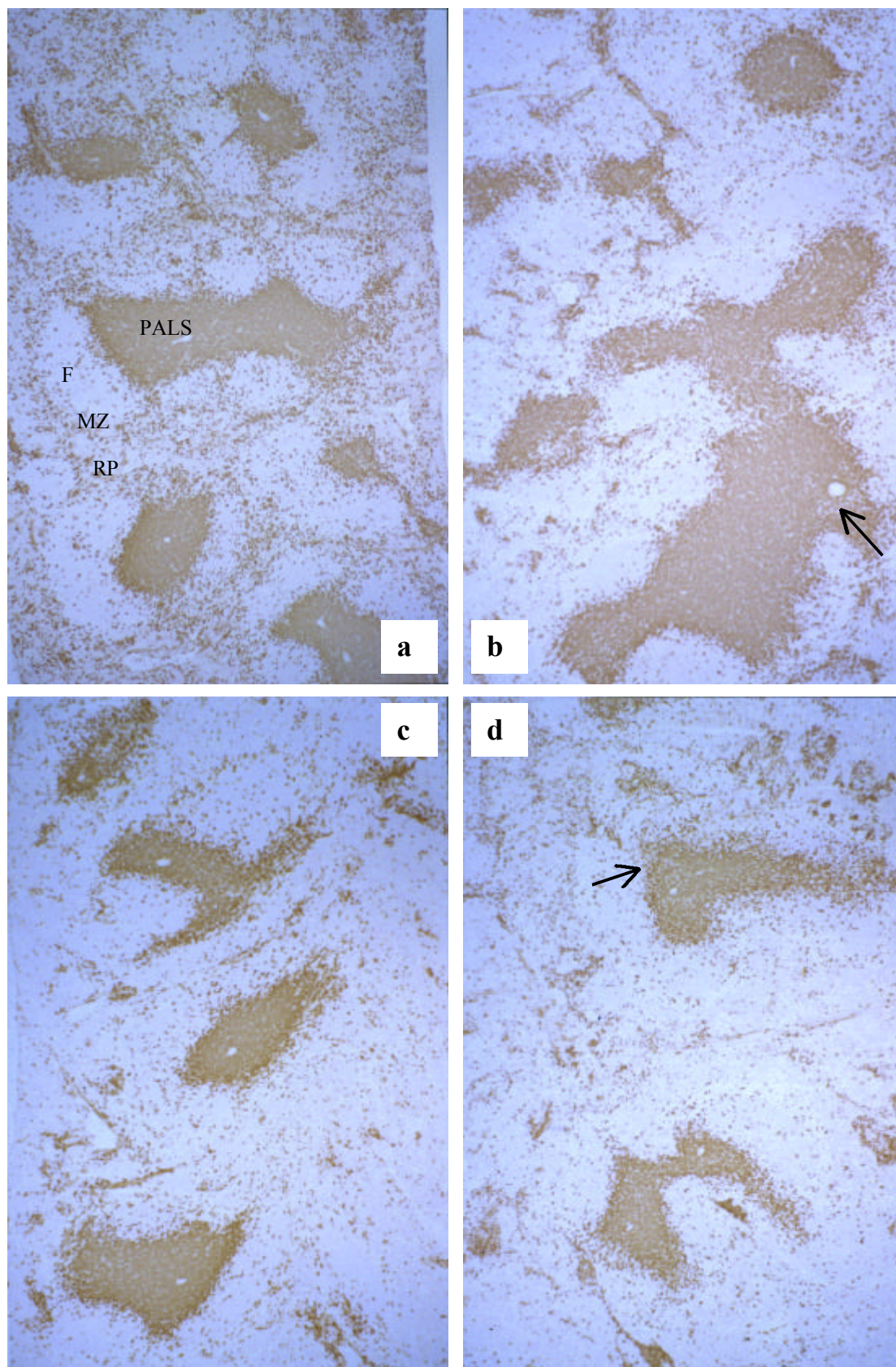


Abb. 13: T-Gesamt-Lymphozyten der Milz (Thy-1.2) x 50 ® Depletion der PALS

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

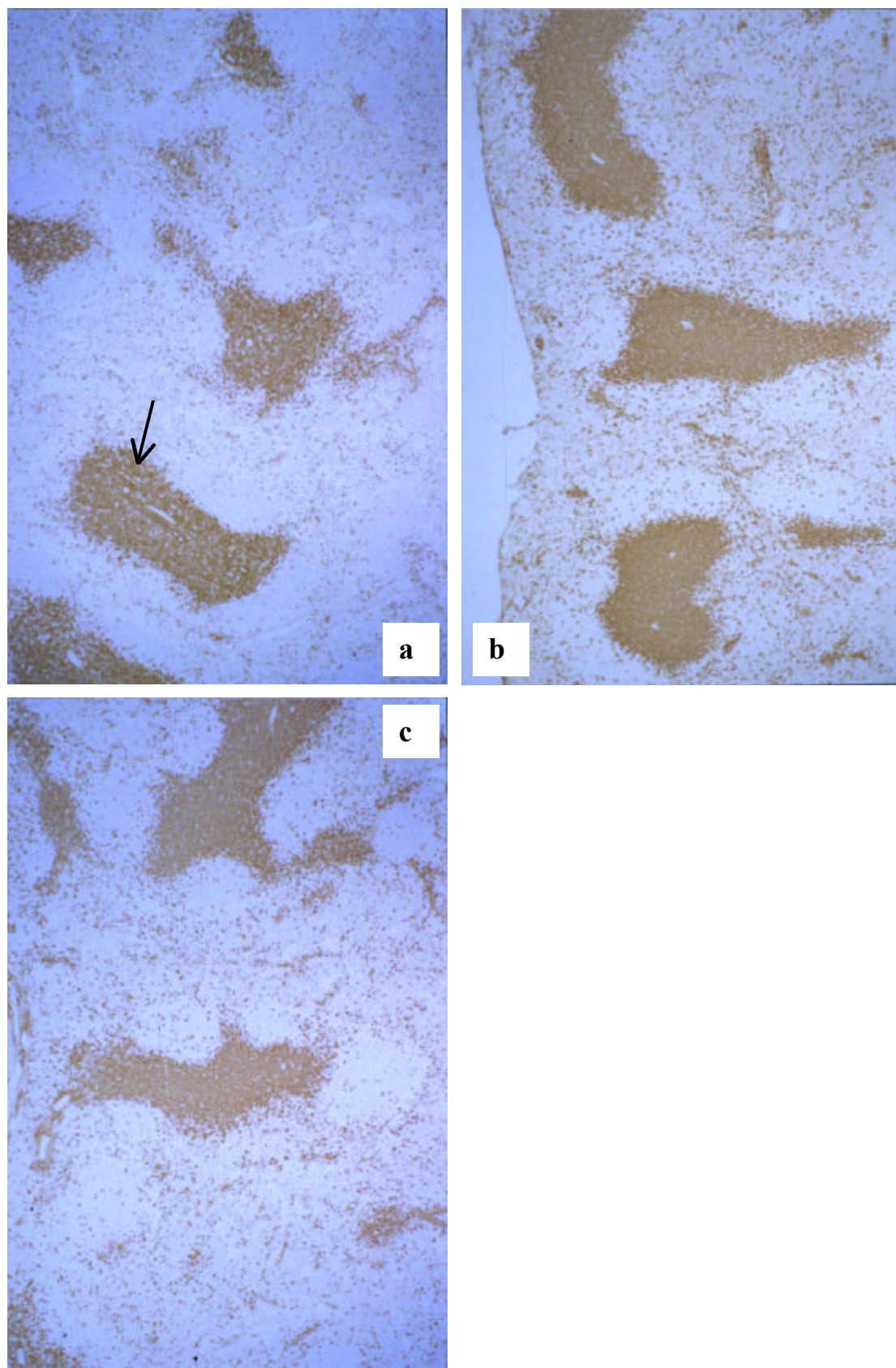


Abb. 14: T-Gesamt-Lymphozyten der Milz (Thy-1.2) x 50 ® Depletion der PALS

a) LPS 24 h

b) Imexon 24 h

c) Dexamethason 24 h

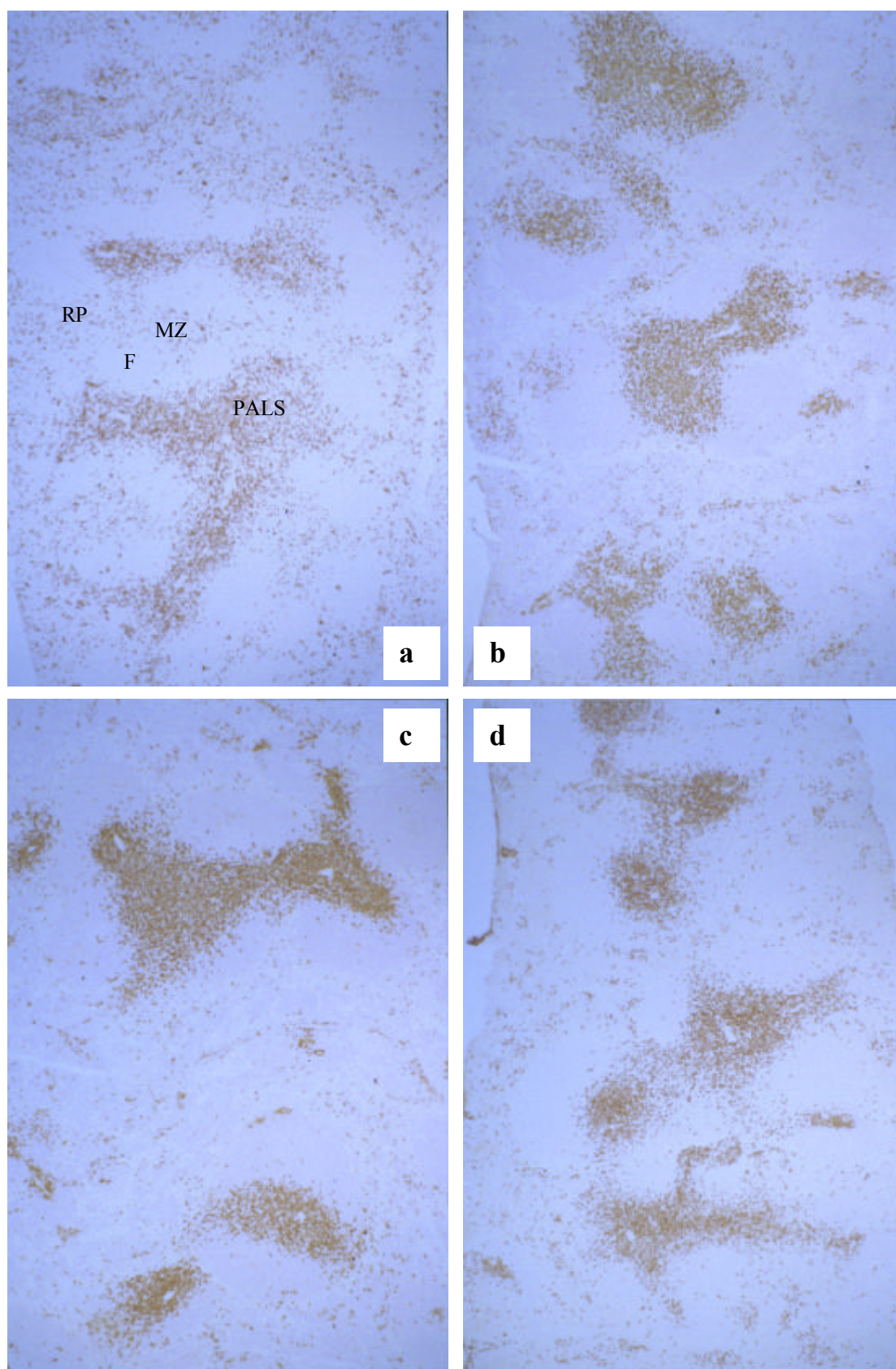


Abb. 15: Zytotoxische und T-Suppressorzellen der Milz (Lyt-2) x 50

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

4.14.2 B-Lymphozyten in der Milz

Die B-Lymphozytenpopulation der Milz wird mit Hilfe von drei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen:

- B220 als B-Gesamt-Zellmarker
- IgG und IgM zur Unterscheidung der Expression verschiedener Immunglobulin-Typen.

Bei allen drei Antikörpern zeigt sich eine braune Membranfärbung. Sie weichen in Zellverteilung und Stärke der Anfärbung nur geringgradig voneinander ab. Mit IgG und IgM sind zusätzlich Plasmazellen anhand der dunklen, leuchtenden Anfärbung ihres etwas breiteren Zytoplasmasaumes darstellbar.

4.14.2.1 Kontrollgruppen

Mit dem monoklonalen Antikörper B220 reagierende Zellen sind in der gesamten Milz vorhanden. In der roten Pulpa liegen sie diffus verteilt als Einzelzellen oder kleinere Zellhaufen oder um Gefäße und terminale Arteriolen gruppiert. Die Marginalzone umgibt als breiter, zellreicher Gürtel PALS und Follikel. Die Zellen liegen hier nur unwesentlich lockerer als im Follikel, wo dicht gelagerte Zellen kaum Zwischenräume offen lassen. Im Follikelzentrum fallen teilweise blasser gefärbte Germinalzentren auf. In der PALS nimmt die Zahl der Zellen von Marginalzone und Follikel ausgehend nach innen immer mehr ab. Im Bereich um die Zentralarterien sind nur wenige B-Lymphozyten zu finden (vgl. Abb. 16a, Abb. 17a).

Bei Färbung mit den Immunglobulinantikörpern weicht das Verteilungsmuster und die Dichte der Zellen vom eben Beschriebenen nur in der PALS ab. Schon in der äußeren PALS sind schwach markierte Zellen in sehr geringer Anzahl zu finden; nur vereinzelt schieben sie sich bis in die inneren Bereiche vor (vgl. Abb. 16a, Abb. 17a). Die Färbung in der roten Pulpa ist außer bei den um die Terminalarteriolen konzentrierten Lymphozyten eher schwach. Aber es werden sehr dunkel zytoplasmatisch gefärbte Plasmazellen besonders in Gefäßnähe und in Gebieten, die dichter an die äußere PALS angrenzen, mit Hilfe der Immunglobulinantikörper sichtbar gemacht. Diese treten bei Färbung mit IgM gehäuft auf.

Bei Reaktion mit dem IgM-Antikörper treten Unterschiede in der Stärke der Expression zwischen den B-Lymphozyten der Marginalzone und denen im Follikelbereich auf. Die Zellen der Marginalzone zeigen eine deutlich kräftigere Anfärbung (vgl. Abb. 16a).

4.14.2.2 Therapiegruppen

4.14.2.2.1 7 h-Gruppen

Die Verabreichung von GalN/LPS führt unabhängig von einer zusätzlichen Behandlung nach sieben Stunden zur weitgehenden Depletion der B-Lymphozyten in der roten Pulpa. Die Zellansammlungen um die Terminalarteriolen bleiben erhalten. Die IgM⁺-Zellen in den Follikel zeigen jetzt in ihrer Anfärbbarkeit keine Unterschiede mehr zu den in der Marginalzone lokalisierten Lymphozyten (vgl. Tab. 29, Abb. 16b - d).

In der LPS-Gruppe und bei den präfinal oder in der Agonie getöteten Tieren der LPS- und der Imexon-Gruppe sind kaum mehr B-Lymphozyten im Bereich der Marginalzone anzutreffen. Die verbleibenden Zellen bilden schmale, meist einzellige Lagen angrenzend an die Follikel (vgl. Abb. 16b). Die Follikel erscheinen geringgradig vergrößert (vgl. Kap. 4.15). Die Zelldichte am Übergang zur PALS nimmt weniger allmählich ab als bei Tieren der Kontrollgruppen. Die Zahl der B-Zellen in der PALS hat etwas abgenommen. In der inneren PALS sind nur vereinzelt B220⁺-Zellen zu finden (vgl. Tab. 29). Bei drei scheinbehandelten Tieren sind die Plasmazellen deutlich vermehrt.

In der Imexon-Gruppe schwankt das Ausmaß der Depletion der Marginalzone sehr stark. Während bei zwei Tieren nur einzelne Zellen in der Marginalzone verblieben sind, ist bei anderen ein unterbrochener Saum aus kleineren Zellgrüppchen zu erkennen (vgl. Abb. 16c). Im Bereich der Follikel ist keine Abweichung von den Tieren der LPS-Gruppe zu erkennen. In der PALS sind mehr B220⁺-Zellen vorhanden als bei den scheinbehandelten Tieren (vgl. Tab. 29).

Unter dem Einfluss von Dexamethason tritt bei keinem Tier eine völlige Depletion der Marginalzone ein. Die Zellen sind in ihrer Anzahl reduziert. Sie liegen eng ein- bis mehrlagig im Follikelrandbereich. Bei den Follikeln ist in Größe und Zelldichte keine Abweichung von den Tieren der LPS-Gruppe zu erkennen. Die Zellzahl in der PALS ist nicht sichtbar verringert (vgl. Tab. 29, Abb. 16d).

4.14.2.2.2 24 h-Gruppen

In der LPS-Gruppe ist die B-Lymphozytenzahl in der roten Pulpa nach vierundzwanzig Stunden noch reduziert, hat aber im Vergleich zu der frühen LPS-Gruppe (7 h) deutlich zugenommen. In der Marginalzone sind bei allen Tieren der Gruppe markierte Zellen anzutreffen. Sie bilden jedoch nur einen schmalen Saum. Die Zahl der B-Lymphozyten in der PALS gleicht der der Kontrolltiere (vgl. Tab. 29, Abb. 17a).

Bei vielen der mit Imexon behandelten Mäuse ist die Zahl der Zellen in der roten Pulpa mit der der Kontrolltiere vergleichbar. Die Marginalzone stellt sich zu diesem Zeitpunkt als mehrlagiger, lockerer Zellgürtel dar, der in manchen Fällen ebenfalls eine Ausdehnung wie bei den Kontrolltieren erreicht. Auch die Zahl der B-Lymphozyten in der PALS gleicht der der Kontrolltiere (vgl. Tab. 29, Abb. 17b).

Bei der Dexamethason-Gruppe gleicht das Bild in der roten Pulpa bei der Mehrzahl der Tiere dem der Kontrollen. Die Marginalzone hingegen ist extrem zellreich und übertrifft im Durchschnitt die der Kontrolltiere sogar an Breite. Der Übergang zum Follikel ist stellenweise schlecht abgrenzbar. Die Zahl der B-Lymphozyten in der PALS gleicht der der Kontrolltiere (vgl. Tab. 29, Abb. 17c).

Tab. 29: B-Zellpopulation (B220, IgM, IgG) der Milz

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe ¹	Rote Pulpa ³	Marginalzone ⁴	Follikel ²	PALS ³
Kontrollgruppe 7 h (3)	3	4	4	3
LPS-Gruppe 7 h (5)	1	1	5	1
Imexon-Gruppe 7 h (6)	1	2	5	2
Dexamethason-Gruppe 7 h (6)	1	3	5	3
Kontrollgruppe 24 h (3)	3	4	4	3
LPS-Gruppe 24 h (7)	2	3	4-5	3
Imexon-Gruppe 24 h (8)	2-3	4	4-5	3
Dexamethason-Gruppe 24 h (10)	3	5	4-5	3
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. 2 Unterschiede in der Stärke der Färbung nur bei IgM erkennbar: 4 = Follikel sichtbar schwächer gefärbt als Marginalzone 5 = Follikel zeigt die gleiche Färbintensität wie Marginalzone 3 Zahlenwerte entsprechen der Zelldichte: von 1 = vereinzelte Zellen bis 5 = dicht gedrängt (vgl. Kap. 3.6.6) 4 Zahlenwerte entsprechen der Zahl der hier lokalisierten Zellen: von 1 = vereinzelte Zellen am Übergang zu Follikel und PALS bis 5 = breiter, sehr zellreicher Gürtel				

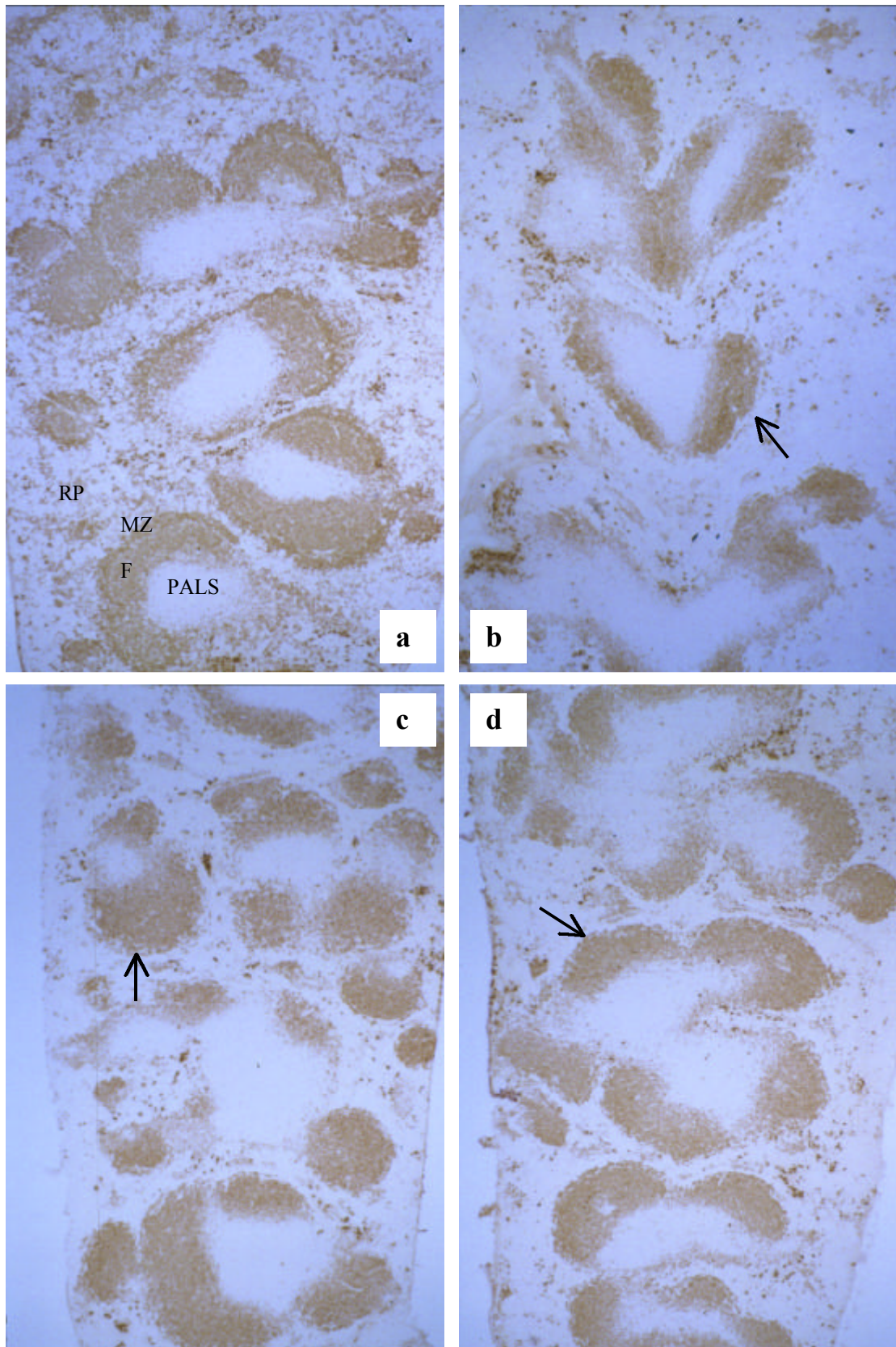


Abb. 16: B-Lymphozyten der Milz (IgM) x 50 ® Depletion der Marginalzone

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

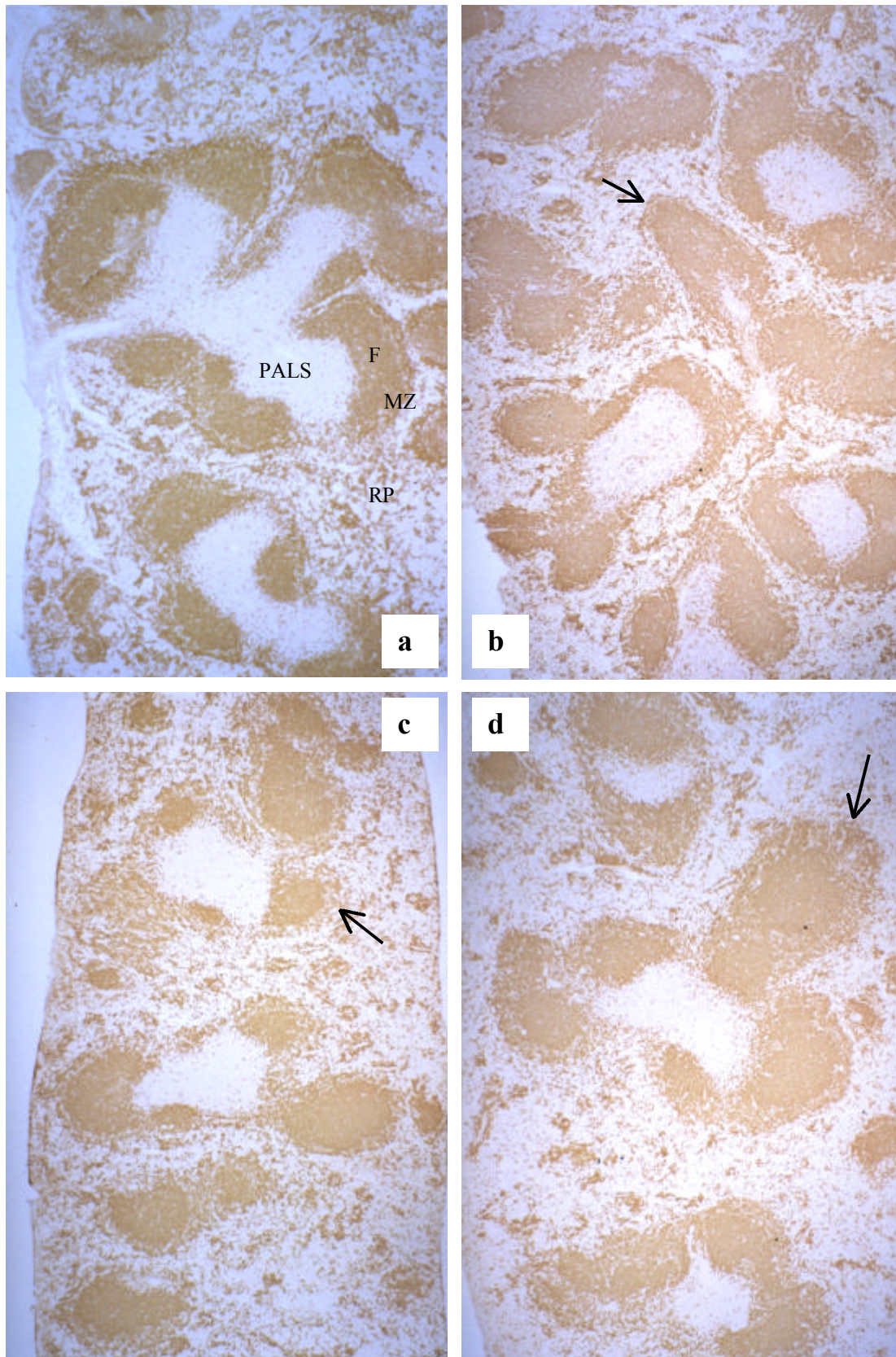


Abb. 17: B-Lymphozyten der Milz (B220) x 50 ® Repopulation der Marginalzone

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 24 h

c) Imexon 24 h

d) Dexamethason 24 h

4.14.3 Makrophagen in der Milz

4.14.3.1 Marginalmetallophile Makrophagen

Die marginalmetallophilen Makrophagen der Milz können mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MOMA-1 selektiv dargestellt werden. Bei Reaktion mit dem Antikörper zeigen die Zellen sehr starke Membran- und nur wenig schwächere, leicht granulierte Zytoplasmafärbung.

4.14.3.1.1 Kontrollgruppen

Die mit dem Antikörper MOMA-1 reagierenden, sogenannten marginalmetallophilen Makrophagen sind am inneren Rand der Marginalzone lokalisiert. Die sich dendritisch verzweigenden Zellen bilden in zwei bis vier Lagen einen breiten Saum um Follikel und PALS. Besonders lange schlanke Ausläufer sind in Richtung der Follikelzentren orientiert (vgl. Abb. 18a).

Um diesen Saum haben sich locker schwächer gefärbte, polymorphe Zellen mit großen, bohnenförmigen Kernen gelagert, die deutlich von einigen sehr schwach positiven Makrophagen in der roten Pulpa zu unterscheiden sind.

4.14.3.1.2 Therapiegruppen

4.14.3.1.2.1 7 h-Gruppen

Sieben Stunden nach alleiniger Stimulation mit GalN/LPS nehmen die MOMA-1⁺-Zellen geringgradig an Zahl ab und lagern sich enger zusammen, wodurch der Zellsaum etwas an Breite verliert. Die Zellen liegen ein- bis zweireihig nebeneinander, sind weniger verzweigt und stärker in Richtung der Follikel ausgerichtet (vgl. Abb. 18b). Bei einigen Zellen deutet sich eine Wanderung aus dem Zellverband in die Follikelkorona an (vgl. Abb. 19a). Die außen liegenden, schwächer positiven Zellen sind in manchen Fällen nicht mehr erkennbar, bei anderen Tieren legen sie sich eng an den inneren Saum an.

Bei der Imexon-Gruppe kommt es neben der Abnahme der Zellzahl des stark gefärbten Saumes zusätzlich zu einer leichten Größenzunahme vieler Zellen. Das Zytoplasma ist stärker gefärbt, mit weniger granuliertem, flächigeren Verteilungsmuster, dadurch verliert die Membran an Kontur. Die Zellen sind stärker abgerundet; die Zahl der Ausläufer auch zur weißen Pulpa hin ist reduziert. Einige isolierte Zellen sind auch hier im Follikelbereich sichtbar (vgl. Abb. 18c,

Abb. 19b). Die außen liegenden, schwächer gefärbten Zellen legen sich wie in der LPS-Gruppe eng an den inneren Saum an.

Das histopathologische Bild der präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere variiert je nach Gruppenzugehörigkeit.

Unter Einfluss von Dexamethason liegen die Zellen etwas weniger eng, so dass der Zellsaum breiter ist als in den beiden anderen Therapiegruppen. Auch die außen liegenden Zellen sind noch teilweise erkennbar. Die Einzelzellen sind weniger vergrößert; die zytoplasmatische Anfärbbarkeit ist verstärkt, jedoch weniger als in der Imexon-Gruppe. Die Zahl der dendritischen Ausläufer ist geringgradig reduziert. Auch in dieser Gruppe sind im Follikel markierte Zellen anzutreffen (vgl. Abb. 18d).

4.14.3.1.2.2 24 h-Gruppen

Nach vierundzwanzig Stunden hat der Zellsaum in der Marginalzone bei allen Gruppen seine ursprüngliche Zelldichte und Mehrlagigkeit wieder erlangt.

In der LPS-Gruppe sind viele Zellen in der Marginalzone jetzt vergrößert, besitzen aber auch wieder etliche dendritische Fortsätze. Die äußeren, blasseren Zelllagen sind gut zu erkennen. MOMA-1⁺-Zellen sind auch im Follikel v.a. in der Follikelkorona anzutreffen.

Auch in der Imexon-Gruppe sind die meisten Zellen in der Marginalzone zu diesem Zeitpunkt vergrößert und haben wieder mehr dendritische Fortsätze. Die Makrophagen exprimieren das Antigen in dieser Gruppe allerdings im Durchschnitt etwas stärker. Wie in der LPS-Gruppe sind positive Zellen auch in der Follikelkorona erkennbar.

Bei der Dexamethason-Gruppe ist die Größenzunahme der Zellen in der Marginalzone kaum geringer. Die Zellen liegen aber weniger eng beisammen und entsenden größtenteils nur ihre Ausläufer bis in die Peripherie der Follikel.

4.14.3.2 Marginalzellenmakrophagen

Die Marginalzellenmakrophagen der Milz können mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers ER-TR9 selektiv dargestellt werden. Die Reaktion mit dem Antikörper führt zu einer deutlich braunen Membranfärbung.

4.14.3.2.1 Kontrollgruppen

Die Marginalzonenmakrophagen bilden in drei bis vier Lagen in der Marginalzone der Milz einen annähernd geschlossenen Saum um die inneren Bereiche der weißen Pulpa. Die auffällig großen, unregelmäßig geformten Zellen mit bohnenförmigem Kern besitzen viele Fortsätze, die sich breitgefächert in alle Richtungen erstrecken. Sie stehen in enger räumlicher Beziehung zu den Lymphozyten der Marginalzone (vgl. Abb. 20a).

4.14.3.2.2 Therapiegruppen

4.14.3.2.2.1 7 h-Gruppen

Sieben Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS ist die Zahl der Marginalzonenmakrophagen in der LPS-Gruppe und bei den präfinal oder in der Agonie getöteten Tieren der LPS- und Imexon-Gruppe stark reduziert, so dass bei der Mehrzahl der Tiere der von ihnen gebildete Saum einlagig und häufig unterbrochen ist. Die verbleibenden Zellen sind am Übergang zu Follikel und PALS lokalisiert. Sie sind gegenüber den Kontrollgruppen vergrößert und haben weniger dendritische Fortsätze (vgl. Abb. 20b).

Bei der Imexon-Gruppe ist die Zahl der Zellen weniger stark reduziert; der meist einlagige Saum ist seltener unterbrochen als bei den scheinbehandelten Tieren. Auch hier sind die Zellen am Übergang zu den inneren Bereichen der weißen Pulpa lokalisiert. Bei einigen Tieren deutet sich neben der Reduktion der Zahl der Zellfortsätze eine Verstärkung der LPS-bedingten Größenzunahme an (vgl. Abb. 20c).

Nach Behandlung mit Dexamethason ist die Abnahme der Zellzahl noch geringer. Die Zellen bilden bei über der Hälfte der Tiere zwei Lagen; der Saum ist häufiger fast geschlossen. Abrundung und Größenzunahme der Zellen sind weniger stark ausgeprägt als bei den scheinbehandelten Tieren (vgl. Abb. 20d).

4.14.3.2.2.2 24 h-Gruppen

Nach vierundzwanzig Stunden sind die Marginalzonenmakrophagen bei allen Therapiegruppen extrem vergrößert und stark abgerundet. Die Zahl der Zellen und Zelllagen nimmt von der LPS- über die Imexon- zur Dexamethason-Gruppe zu, erreicht aber nur teilweise die der Kontrolltiere. Die Zahl der Tiere mit geschlossenem Saum steigert sich in gleicher Abstufung.

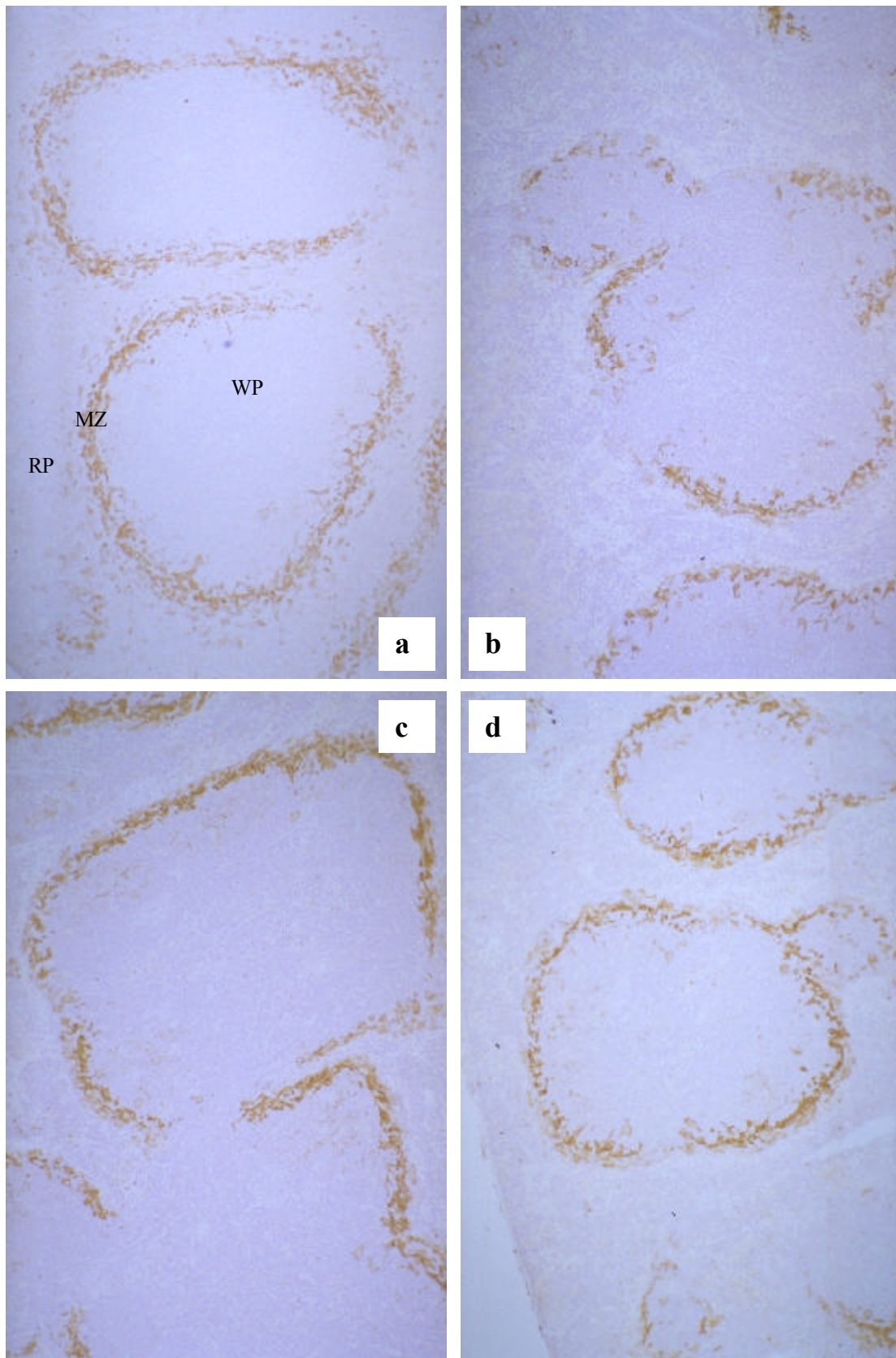


Abb. 18: Marginalmetallophile Makrophagen der Milz (MOMA-1) x 100

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

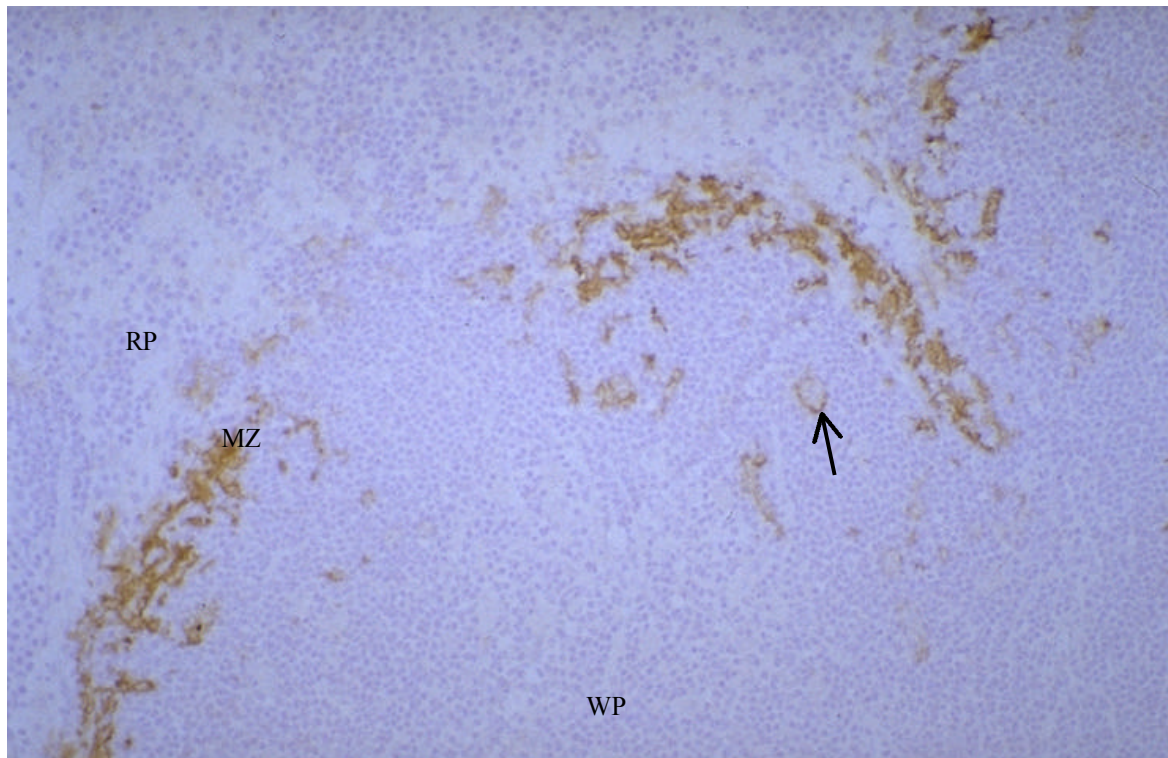


Abb. 19a: Marginalmetallophile Makrophagen der Milz (MOMA-1) LPS 7 h x 200

® MOMA-1-positive Zelle in Follikel

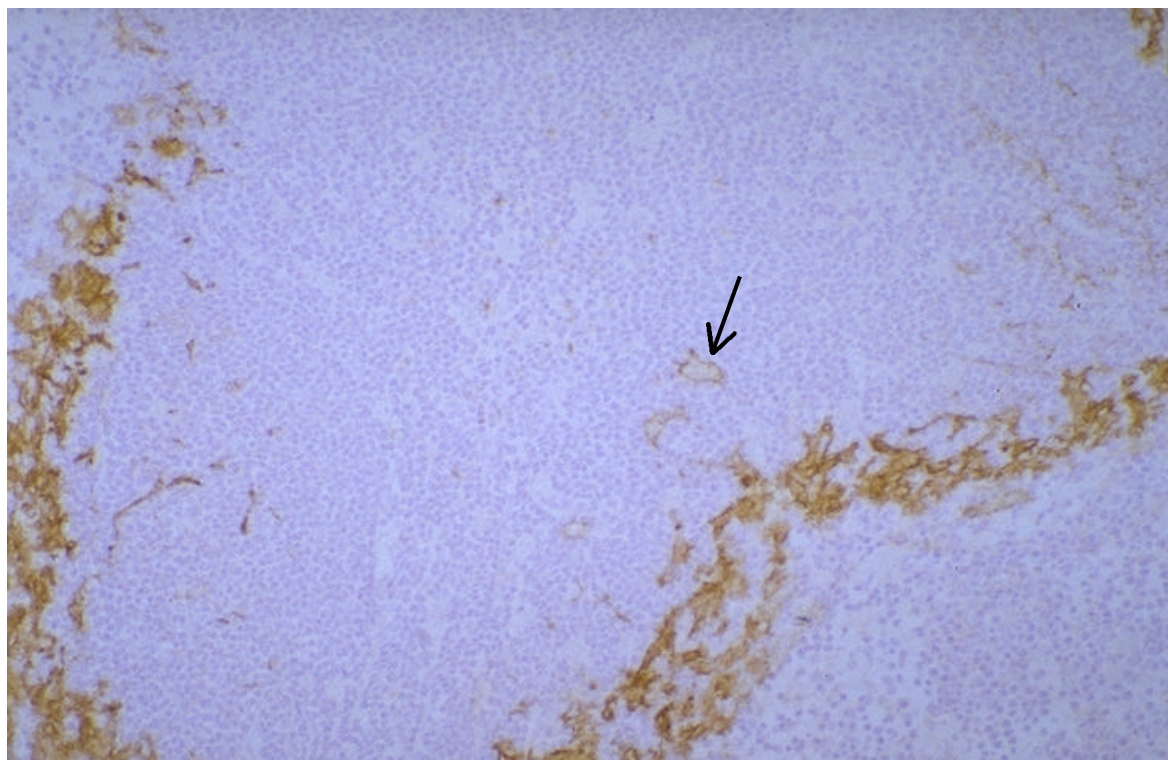


Abb. 19b: Marginalmetallophile Makrophagen der Milz (MOMA-1) Imexon 7 h x 200

® MOMA-1-positive Zelle in Follikel

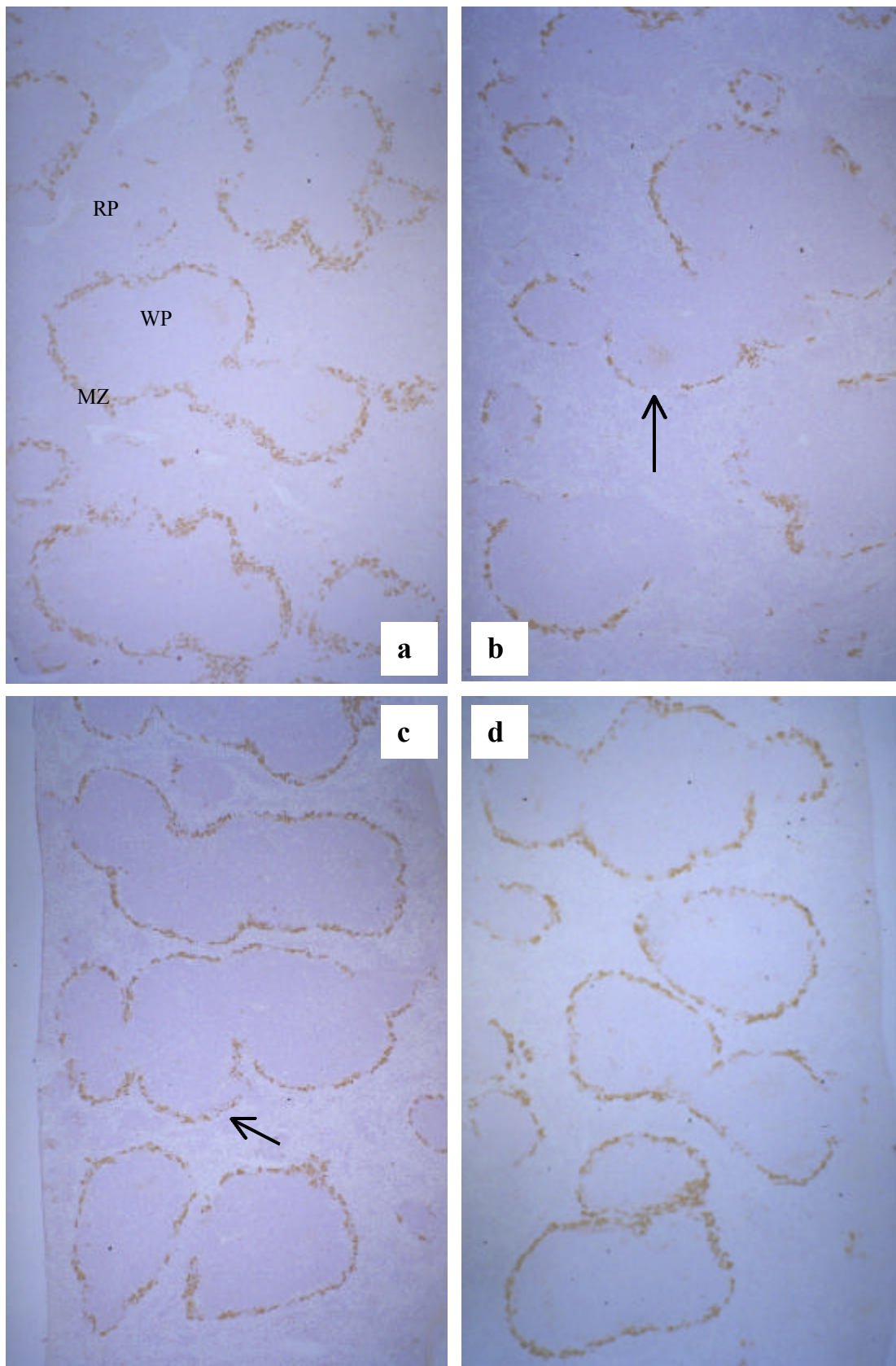


Abb. 20: Marginalzonenmakrophagen der Milz (ER-TR9) x 50® Depletion der Makrophagen

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

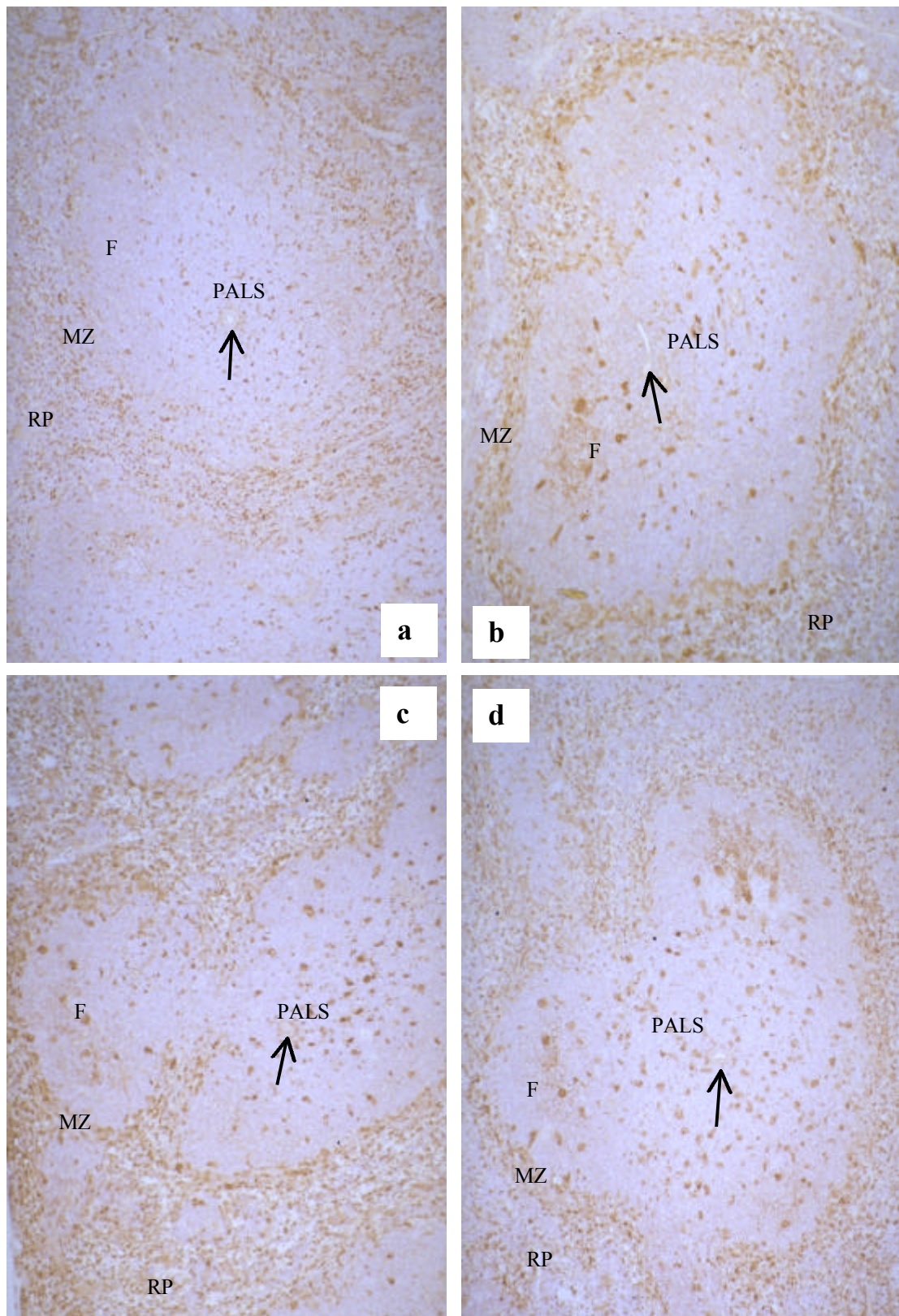


Abb. 21: Gewebsmakrophagen der roten und weißen Pulpa der Milz (MOMA-2) x 100

® Zentralarterie PALS

a) PBS-Kontrolle

c) Imexon 7 h

b) LPS 7 h

d) Dexamethason 7 h

Makrophagen in Follikel und PALS stark vergrößert

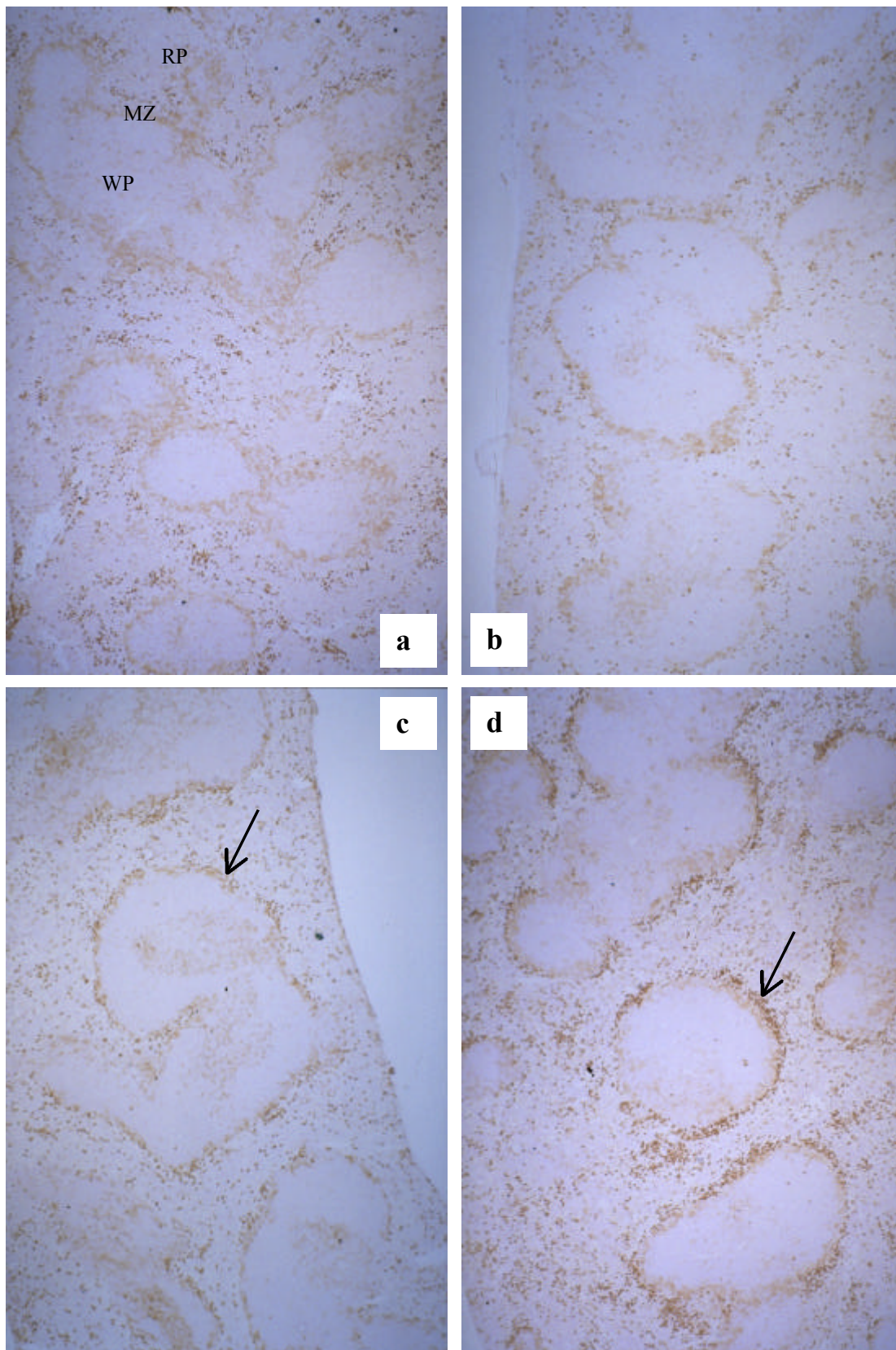


Abb. 22: Gewebsmakrophagen und Granulozyten der Milz (MAC-1) x 50

® Granulozytenkonzentrierung um die Marginalzone

a) PBS-Kontrolle

b) LPS 7 h

c) Imexon 7 h

d) Dexamethason 7 h

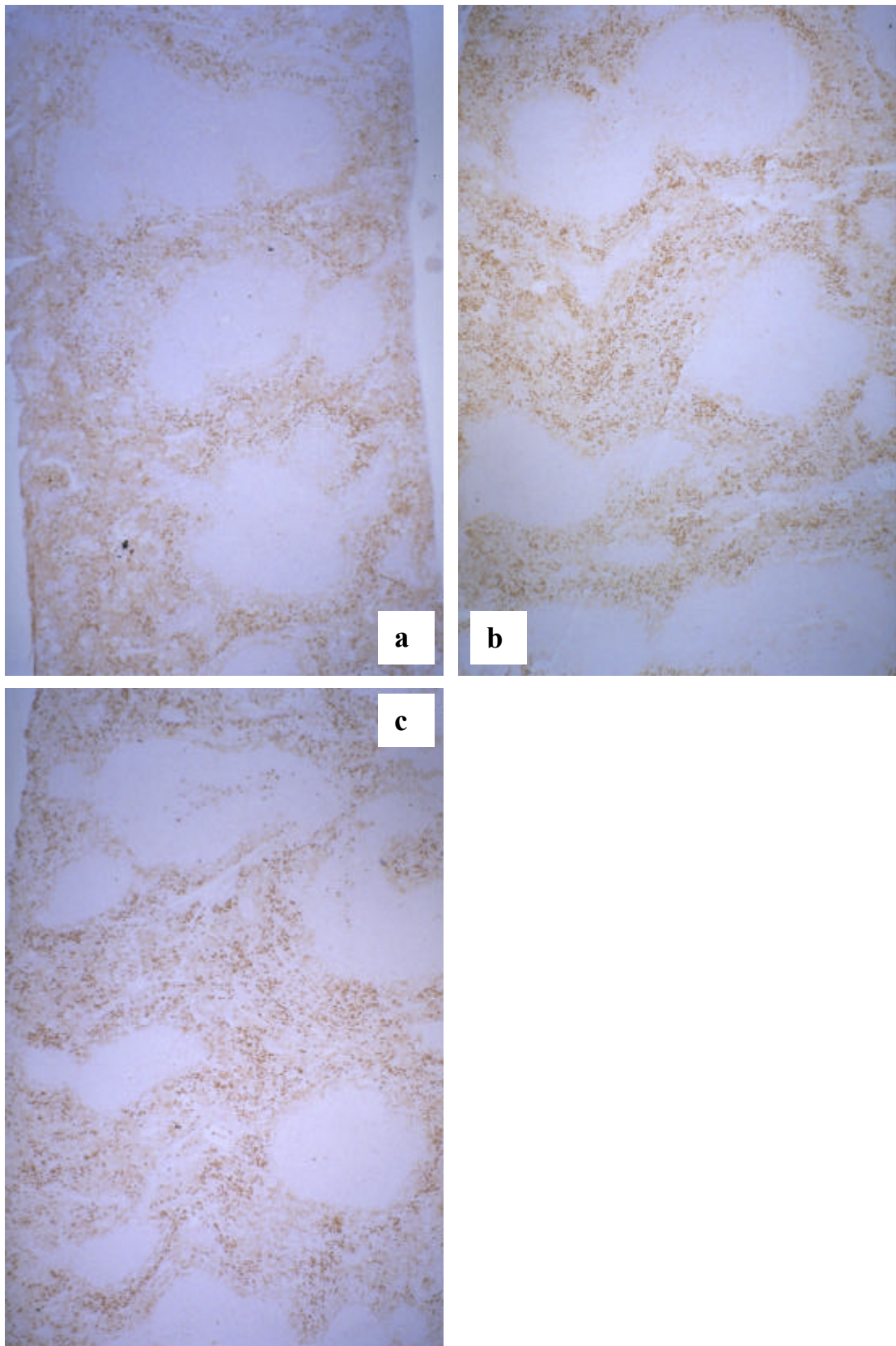


Abb. 23: Gewebsmakrophagen und Granulozyten der Milz (MAC-1) x 50 [®] Granulozytenanhäufung und Verstärkung der MAC-1-Expression bei Makrophagen der roten Pulpa

a) LPS 24 h

b) Imexon 24 h

c) Dexamethason 24 h

4.14.3.3 Makrophagen der roten Pulpa

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers F4/80 sind neben Monozyten in erster Linie die Makrophagen in der roten Pulpa darstellbar. Die positiven Zellen zeigen eine starke braune Membranfärbung. Die Färbung des Zytoplasmas ist meist schwächer und leicht granuliert.

4.14.3.3.1 Kontrollgruppen

Bei den Kontrolltieren ist die gesamte rote Pulpa durchsetzt von einer Vielzahl mittelgroßer polymorpher Zellen mit großem bohnenförmigen Kern. Das Zytoplasma ist schwach, bei einigen Zellen auch stärker granuliert gefärbt. Die Ausläufer vieler Makrophagen sind dicht miteinander verwoben. Dazwischen sind kleinere ungefärbte Bereiche zu erkennen, in denen Gefäße und v.a. Lymphozyten und Megakaryozyten liegen. Einzelne Makrophagen und viele Zellfortsätze ragen in die weiße Pulpa hinein.

Auch in der Marginalzone und der PALS befinden sich einige allerdings schwächer gefärbte Zellen.

4.14.3.3.2 Therapiegruppen

4.14.3.3.2.1 7 h-Gruppen

Zu diesem Zeitpunkt sind bei den Tieren aller Gruppen die Makrophagen in der roten Pulpa enger zusammengedrückt. Es sind nur noch wenige ungefärbte Bereiche zu erkennen. Die Zellen an der Grenze zur Marginalzone haben sich dichter zusammengelagert und bilden einen beinahe geschlossenen Rand. Es sind kaum mehr in die weiße Pulpa gerichtete Zellfortsätze vorhanden.

In der LPS-Gruppe fallen nach sieben Stunden etwas mehr Zellen mit stark gefärbtem, breiterem Zytoplasmasaum auf.

Unter Imexon-Behandlung sind fast alle Zellen vergrößert. Die zytoplasmatische Expression der F4/80-Determinante ist ebenfalls erhöht.

Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppe zeigen eine hochgradige verstärkte Anfärbbarkeit der Makrophagen. Die Größenzunahme spiegelt die jeweilige Gruppenzugehörigkeit wider.

Die mit Dexamethason behandelten Tiere nehmen im Hinblick auf Anzahl und Größe der stärker exprimierenden Zellen eine Zwischenstellung zwischen den beiden obengenannten ein.

4.14.3.3.2.2 24 h-Gruppen

Nach vierundzwanzig Stunden sind die Zellen bei allen Tieren stark vergrößert. Es sind fast keine Zwischenräume mehr erkennbar. Die granulierte zytoplasmatische Expression ist bei den nur mit GalN/LPS stimulierten Tiere deutlich verstärkt. Sie steigert sich aber zusätzlich in der Imexon- und noch mehr in der Dexamethason-Gruppe. Die Auflockerung der Zellen am Übergang zur weißen Pulpa nimmt bei der Imexon-Gruppe etwas, in der Dexamethason-Gruppe stark zu.

4.14.3.4 Gewebsmakrophagen der roten und weißen Pulpa

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MOMA-2 sind neben den Makrophagen der roten Pulpa und der Marginalzone auch die in Follikel und PALS darstellbar. Die Reaktion erfolgt zum überwiegenden Teil im Zytoplasma. Die Zellen zeigen eine schwach bis deutlich braune, stark granulierte Anfärbung.

Auch dendritische Zellen im Follikel werden angefärbt. Sie zeigen ein punktförmiges Reaktionsmuster im Zytoplasma.

4.14.3.4.1 Kontrollgruppen

Kleinere, polymorphe Makrophagen reagieren mit dem Antikörper in großer Zahl in der roten Pulpa. In der Marginalzone hingegen färben sich nur einige Makrophagen schwach an. Diese sind von Lymphozyten umgeben, wodurch sie sich nicht direkt an die rote Pulpa anschließen. Neben einigen kleinen Makrophagen im Follikel werden wenige sehr große und intensiv gefärbte Zellen aufgrund der abgerundeten Form und des typischen, im Zytoplasma erkennbaren phagozytierten Zellmaterials als Tingible-body-Makrophagen angesprochen. Außerdem sind in diesem Bereich Follikular-dendritische-Zellen in Form netzartiger Strukturen zu erkennen, die sich punktförmig sehr dunkel anfärben. In der PALS sind die meisten der zahlreichen schmalen und vielgestaltigen Makrophagen stark MOMA-2-positiv (vgl. Abb. 21a).

4.14.3.4.2 Therapiegruppen

4.14.3.4.2.1 7 h-Gruppen

Nach sieben Stunden erscheinen die Makrophagen der roten Pulpa und der Marginalzone bei allen Gruppen etwas vergrößert (vgl. Abb. 21b - d).

In der Gruppe der scheinbehandelten Tiere übertrifft die MOMA-2-Expression der Marginalzonenmakrophagen jetzt die der Makrophagen in der roten Pulpa, an die sie aufgrund der Lymphozytendepletion dicht herangerückt sind. Die Zahl der vergrößerten, phagozytierenden Makrophagen hat im Follikel stark, die in der PALS nur geringgradig zugenommen (vgl. Abb. 21b).

Unter Behandlung mit Imexon ist der Unterschied in der MOMA-2-Expression zwischen den Makrophagen der roten Pulpa und der Marginalzone weniger deutlich als in der LPS-Gruppe. Die Zahl der Tingible-body-Makrophagen im Follikel ist ebenso stark angewachsen wie die der phagozytierenden Makrophagen in den T-Zellarealen (vgl. Abb. 21c).

Die bei den präfinal oder in der Agonie getöteten Tieren auftretenden Veränderungen unterscheiden sich entsprechend der jeweiligen Behandlung.

In der Dexamethason-Gruppe ist die Expression der MOMA-2⁺-Marginalzonenmakrophagen kaum stärker als in der Imexon-Gruppe. Das Verhältnis der vergrößerten aktivierten Makrophagen in der weißen Pulpa ist hier noch stärker zugunsten der PALS verschoben (vgl. Abb. 21d).

4.14.3.4.2.2 24 h-Gruppen

Die Makrophagen in der roten Pulpa und der Marginalzone haben bei allen Gruppen zu diesem Zeitpunkt deutlich an Größe zugenommen; das Zytoplasma ist kräftig braun granuliert.

Bei der LPS-Gruppe grenzt der Saum der Marginalzonenmakrophagen noch immer eng an die rote Pulpa. Auch die Zellen in der weißen Pulpa zeigen verstärkte Phagozytoseaktivität.

Nach Imexon-Behandlung ist die Lokalisation der Marginalzonenmakrophagen recht unterschiedlich, bei einigen Tieren lagern sie sich eng an die Makrophagen der roten Pulpa an, bei anderen sind Zwischenräume zu erkennen. Die Zahl der vergrößerten Zellen ist vor allem im Follikel zurückgegangen.

Bei den Tieren der Dexamethason-Gruppe rücken die Marginalzonenmakrophagen weiter von einander und auch von der roten Pulpa ab. In Follikel und PALS sind die meisten Zellen kaum noch vergrößert.

4.14.3.5 Gewebsmakrophagen und Granulozyten

Der monoklonale Antikörper MAC-1 bindet an den C3-Rezeptor auf Makrophagen und Granulozyten. Die Granulozyten erscheinen als kleine rundliche leuchtend gefärbte Zellen mit schmalem Zytoplasmasaum und segmentiertem Kern. Die Expression der Makrophagen ist deutlich schwächer. Die Zellen zeigen eine leicht granuliert, sehr inhomogene Farbverteilung.

4.14.3.5.1 Kontrollgruppen

Bei der Färbung mit MAC-1 fallen in der roten Pulpa zuerst einige leuchtend gefärbte Granulozyten auf. Sie bilden Nester in Sinusoiden und um Gefäße oder verteilen sich gleichmäßig über die rote Pulpa (vgl. Abb. 22a).

Die Makrophagen in den Pulpasträngen treten mit ihrer schwächeren Expression stark in den Hintergrund. In der Marginalzone sind einige breitgefächerte Makrophagen ebenso blass angefärbt. Sie sind durch einen Saum, hier nur durch die Gegenfärbung erkennbarer Lymphozyten, von den Makrophagen der roten Pulpa getrennt (vgl. Abb. 22a).

4.14.3.5.2 Therapiegruppen

4.14.3.5.2.1 7 h-Gruppen

Die Granulozyten sind in ihrer Anzahl bei den scheinbehandelten Tieren nach sieben Stunden nicht vermehrt. Bei einem der Tiere sowie bei den präfinal oder in der Agonie getöteten Tieren der LPS- und der Imexon-Gruppe sind sogar weniger der leuchtend gefärbten Zellen in der roten Pulpa zu finden. Bei den anderen mit Imexon behandelten Tieren hingegen kommt es meist zu einer merklichen Zunahme der Granulozyten mit Zellanhäufungen in der Nähe der Marginalzone. Nur nach Dexamethason-Behandlung jedoch treten Granulozyten in Massen auf. Einige verteilen sich in der roten Pulpa. Der überwiegende Teil aber konzentriert sich um die Marginalzone und umgibt die weiße Pulpa in einem breiten, dichten Saum (vgl. Abb. 22b - d).

Die Makrophagen in der roten Pulpa exprimieren bei einigen Tieren der LPS-Gruppe und insbesondere bei den präfinal oder in der Agonie getöteten den C3-Rezeptor deutlich

schwächer als bei den Kontrolltieren. Sie sind teilweise kaum mehr zu erkennen. Nach Behandlung mit Imexon kommt es auch bei den moribunden Tieren nicht zu einer Abschwächung der Anfärbbarkeit der Makrophagen, bei den Tieren der Dexamethason-Gruppe ebenfalls nicht (vgl. Abb. 22a - d).

In der Marginalzone rückt durch die Abwanderung der B-Lymphozyten auch bei Darstellung mit diesem Antikörper der Saum der markierten Makrophagen näher an die rote Pulpa heran. Der Abstand zwischen den Makrophagen der roten Pulpa und denen der Marginalzone spiegelt die Stärke der Lymphozytendepletion wider. Er ist in der LPS-Gruppe sehr klein und schwankt in der Breite bei den beiden anderen Gruppen (vgl. Abb. 22b - d).

4.14.3.5.2.2 24 h-Gruppen

Nach vierundzwanzig Stunden hat sich die Granulozytenzahl bei allen Tieren extrem erhöht. Während bei der LPS- und der Dexamethason-Gruppe größere Zellansammlungen in Nähe der Marginalzone vorhanden sind, ist bei der Imexon-Gruppe kein spezifisches Verteilungsmuster zu erkennen. In keinem Fall tritt, wie nach sieben Stunden, eine Konzentrierung um die Marginalzone auf (vgl. Abb. 23a - c).

Bei den Makrophagen der roten Pulpa kommt es zu diesem Zeitpunkt bei allen Gruppen, besonders aber unter dem Einfluss von Imexon, zur Verstärkung der Expression. Die Marginalzonenmakrophagen sind in der LPS- und der Imexon-Gruppe wenig, nach Dexamethason-Behandlung deutlich von der roten Pulpa abgerückt (vgl. Abb. 23a - c).

4.15 Morphometrie

Bei den scheinbehandelten Tieren ist sieben Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS sowohl der kleinste als auch der größte Durchmesser der B-Zellfollikel in der Milz gegenüber den Kontrolltieren im Mittel um 18,8 % bzw. um 27,2 % signifikant ($p \leq 0,05^*$) vergrößert (vgl. Tab. 30).

Nach vierundzwanzig Stunden ist der kleinste Durchmesser in der LPS-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p \leq 0,05^*$), jedoch weniger stark, im Mittel um 15,7 %, vergrößert. Der größte Durchmesser zeigt aufgrund der starken Streuung in der Kontrollgruppe keine signifikante Abweichung (vgl. Tab. 31).

Die Behandlung mit Imexon hat weder nach sieben Stunden noch nach vierundzwanzig Stunden einen signifikanten Einfluss auf die Größenveränderungen im Follikel.

Die Behandlung mit Dexamethason beeinflusst die Vergrößerung der Follikel nach sieben Stunden ebenfalls nicht. Jedoch nach vierundzwanzig Stunden weicht der kleinste Durchmesser der Follikel im Mittel signifikant ($p \leq 0,05^*$) um 9,3 %, der größte sogar hochsignifikant ($p \leq 0,01$) um 9,7 % gegenüber der LPS-Gruppe (24 h) nach unten ab (vgl. Tab. 31).

Tab. 30: Diameter der B-Zellfollikel (7 h-Werte)

Gruppe	Mittelwerte $\bar{x}$ der kleinsten Diameter der B-Zellfollikel [mm] nach 7 h (+/- SEM)	Mittelwerte $\bar{x}$ der größten Diameter der B-Zellfollikel [mm] nach 7 h (+/- SEM)
Kontrollgruppe	181,14 (6,00)	277,55 (21,84)
LPS-Gruppe ¹	215,16* (4,25)	353,08* (13,04)
Imexon-Gruppe	226 (11,03)	337,85 (15,31)
Dexamethason-Gruppe	225,57 (8,34)	333,17 (15,81)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.4.1		

Tab. 31: Diameter der B-Zellfollikel (24 h-Werte)

Gruppe	Mittelwerte $\bar{x}$ der kleinsten Diameter der B-Zellfollikel [mm] nach 24 h (+/- SEM)	Mittelwerte $\bar{x}$ der größten Diameter der B-Zellfollikel [mm] nach 24 h (+/- SEM)
Kontrollgruppe	176,31 (9,00)	294,35 (24,6)
LPS-Gruppe ¹	204,02* (4,92)	289,72 (7,92)
Imexon-Gruppe ¹	199,43 (5,45)	287,81 (14,54)
Dexamethason-Gruppe	184,97* (4,94)	261,57** (5,93)
1 Die präfinal oder in der Agonie getöteten Tiere der LPS- und Imexon-Gruppen wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt. * $p \leq 0,05$ (U-Test) ** $p \leq 0,01$ (U-Test) Einzelwerte vgl. Kap. 9.2.3.4.2		

5 Diskussion

Die pathologischen Veränderungen im GalN/LPS-Hepatitis-Modell sind geprägt von der toxischen Wirkung der Lipopolysaccharide (Galanos et al. 1979). Diese bewirken die charakteristischen Schädigungen in erster Linie über immunpathologische Mechanismen (Chojkier und Fierer 1985, Tiegs et al. 1989, Wendel 1990). Bei vorangegangenen Untersuchungen (Deschl 1999) konnte bereits gezeigt werden, dass der Immunmodulator Imexon den Ablauf der immunpathologischen Vorgänge in diesem Modell positiv beeinflusst. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirksamkeit von Imexon im GalN/LPS-Modell zu überprüfen und den Einfluss der Substanz auf die Pathomechanismen des GalN/LPS-Hepatitis-Modells unter Zuhilfenahme immunhistologischer Färbungen näher zu charakterisieren. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung verschiedener Zellpopulationen der Milz gelegt. Als Vergleichssubstanz wurde Dexamethason eingesetzt, dessen schützende Wirkung im GalN/LPS-Hepatitis-Modell bei prophylaktischer Gabe bekannt ist (Tiegs et al. 1989).

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen (Deschl 1999) über die positive Wirkung von Imexon auf den Krankheitsverlauf im GalN/LPS-Hepatitis-Modell bestätigt werden.

5.1 Letalität

Die Letalität der experimentell durch GalN/LPS ausgelösten Erkrankung lag im vorliegenden Versuch bei 25 %. Beim kombinierten Einsatz von GalN und LPS treten Todesfälle zu einem früheren Zeitpunkt auf als ohne Sensibilisierung durch GalN; die Mehrzahl der Tiere stirbt zwischen der fünften bzw. sechsten und der neunten Stunde post injectionem (Galanos et al. 1979, Lehmann et al. 1987). Auch im vorliegenden Versuch traten Todesfälle nur zwischen der siebten und der neunten Stunde nach Verabreichung von GalN/LPS auf. Durch vorbeugende Behandlung mit Imexon konnte die Letalität um die Hälfte auf 12,5 % reduziert werden. Der Eintritt des Todes wurde dadurch aber nicht verzögert. Die prophylaktische Verabreichung von Dexamethason stellte in 100 % der Fälle einen wirksamen Schutz dar.

5.2 Klinik

Während die Tiere der Kontrollgruppen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg ohne beobachtbaren Befund blieben, konnten bei allen Tieren der Therapiegruppen klinische Krankheitssymptome beobachtet werden. Alle Tiere der LPS-Gruppen zeigten, beginnend mit der sechsten Stunde, gesträubtes Fell, eingeschränkte lokomotorische Aktivität, Apathie und mehr oder weniger ausgeprägte Kreislaufschwäche. Das Auftreten von klinischen Symptomen erst-

mals kurz vor den ersten Todesfällen ist charakteristisch für das GalN/LPS-Hepatitis-Modell (Lehmann et al. 1987). Bei den überlebenden Tieren war nach vierundzwanzig Stunden bereits eine deutliche Besserung des Allgemeinzustandes zu verzeichnen. Imexon veränderte nichts an der beschriebenen Symptomatik. Unter dem Einfluss von Dexamethason waren die Tiere zwar nicht so bewegungsfreudig, aber Kreislaufstörungen und Apathie, wie in den anderen Therapiegruppen, waren nicht vorhanden. Untersuchungen an Ratten (Pezeshki et al. 1996) geben Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Serumzytokinspiegel, v.a. von IL1 β und IL6, nach LPS-Stimulation, und der zu beobachtenden Symptomatik. Dexamethason hemmt den Serumanstieg verschiedener LPS-induzierter Zytokine (Chensue et al. 1991, Ulich et al. 1991), was die Abschwächung der Symptomatik erklären kann. Die Bewegungsfreudigkeit konnte aber auch in obigen Untersuchungen durch Dexamethason bzw. die Dexamethason-bedingte Absenkung der Zytokinspiegel nicht aufrecht erhalten werden (Pezeshki et al. 1996). Das Ausbleiben einer klinischen Besserung durch Imexon könnte im Umkehrschluss durch das Fehlen der Zytokinreduktion im Serum (Deschl 1999, vgl. auch Kap 5.4) bedingt sein.

5.3 Leber

Bei der durch GalN/LPS experimentell ausgelösten Erkrankung ist die Leber das primär geschädigte Organ (Bohlinger et al. 1996). Die Schwere der Erkrankung kann anhand des Grades der Leberschädigung beurteilt werden (Chojkier und Fierer 1985, Wendel 1990). Im vorliegenden Versuch erfolgte die Beurteilung der Leberschädigung mittels histopathologischer Untersuchung und durch Bestimmung des Serumspiegels der Transaminasen (ASAT/ ALAT).

5.3.1 Histopathologie

Das histopathologische Bild der Leber in der LPS-Gruppe sieben Stunden nach der Verabreichung einer Kombination von LPS und GalN war geprägt von apoptotisch veränderten Zellen, vereinzelt traten auch Einzelzellnekrosen auf. Das Ausmaß der Zellschädigung verschiedener Individuen streute stark. Bei der Mehrzahl der Tiere war die Bälkchenstruktur bis auf die Bereiche um die Glissonsche Trias durch die Zelluntergänge weitgehend aufgelöst. Die Streuung der Stärke der Veränderungen liegt vermutlich in einer unterschiedlichen individuellen Reaktionsbereitschaft der Tiere begründet. Die Reaktionen der Tiere auf LPS-Stimulation sind in starkem Maße von äußeren Faktoren wie Alter, Geschlecht, Fütterung, Tageszeit, individuelle Stressbereitschaft etc. beeinflusst und können in Abhängigkeit vom Immunstatus größeren Schwankungen unterliegen (Groeneveld et al. 1988, Wendel 1990, Mizobe et al. 1997).

Nach Vorbehandlung mit Imexon fiel die Leberschädigung im Durchschnitt geringer aus. Apoptosen traten weniger gehäuft, Nekrosen nur selten auf. Die Gewebsstruktur war insgesamt deutlich besser erhalten. Aufgrund seines Einflusses auf den Redoxstatus empfindlicher Zellen (vgl. Kap. 5.4) wäre eine direkte Beeinflussung der Apoptoseneigung von Hepatozyten durch Imexon denkbar. Allerdings trat nicht in jedem Fall eine Apoptosehemmung ein. Die Befunde der einzelnen Tiere wiesen eine noch breitere Streuung auf als in der LPS-Gruppe. Die Veränderungen reichten von nur vereinzelt Apoptosen bis hin zu flächenhaftem Auftreten und Zerstörung der Gewebsstruktur v.a. bei den Tieren, die in der Agonie getötet werden mussten. Bei diesen Tieren ist auch keine substanzabhängige Abweichung in Art und Ausprägung der Zelluntergänge von denen der scheinbehandelten Tiere festzustellen. Die auffällige Streuung in der Stärke der Veränderungen unter dem Einfluss von Imexon könnte auf dessen Wirkung als Immunmodulator basieren. Imexon beeinflusst in Abhängigkeit vom Immunstatus immunologische Reaktionen wie z.B. die Aktivierung von Makrophagen (Bicker und Hebold 1977b, Bicker 1978b), der ein großer Einfluss auf die Reaktionsbereitschaft der Tiere im Zusammenhang mit der LPS-Stimulation zugesprochen wird (Groeneveld et al. 1988, Shiratori et al. 1995). Die starken Schwankungen der Apoptosehemmung unter Substanz-einfluss lassen daher eine direkte Beeinflussung der Apoptoseneigung von Hepatozyten unwahrscheinlich erscheinen.

Unter dem Einfluss von Dexamethason waren nach sieben Stunden, abgesehen von einer leichten vakuoligen Degeneration (vgl. Kap. 4.9.3.1) und ganz vereinzelt Apoptosen bei manchen Tieren, keine histopathologischen Veränderungen sichtbar. Dieses Ergebnis bestätigt die von Tiegs et al. (1989) anhand der Serumspiegel von SDH, ASAT und ALAT gemessene Hemmung der Leberschädigung im GalN/LPS-Hepatitis-Modell durch Dexamethason.

Vierundzwanzig Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS zeigten die Tiere der LPS-Gruppe von den Zentralvenen ausgehende, teilweise zu Brückennekrosen konfluierende Nekrosen mit starker Infiltration von Leukozyten und Abräumreaktionen. Apoptosen waren kaum vorhanden. $\text{TNF}\alpha$, einer der Hauptmediatoren im GalN/LPS-Hepatitis-Modell (Tiegs et al. 1989, vgl. auch Kap. 2.3.3), kann in Abhängigkeit von Zelltyp und Zustand der Zielzelle Nekrose oder Apoptose auslösen (Laster et al. 1988, Bohlinger et al. 1996). Leist et al. (1994) wiesen nach, dass $\text{TNF}\alpha$ bei Hepatozyten Apoptose auslöst, wenn die Transkription durch GalN gehemmt ist. Sowohl Tiegs und Wendel (1988) als auch Leist et al. (1995a) beschreiben aber nach der Verabreichung von GalN/LPS auch das Auftreten von Nekrosen, die von den Zentralvenen ausgehen. Leist et al. (1995a) stellen für das vorliegende Modell die Hypothese auf, dass durch die extrem hohe Zahl an Apoptosen die umgebenden Zellen mit der unschädlichen Beseitigung der veränderten Zellen überlastet sind, so dass es sekundär zur Schädigung des umliegenden Gewebes und zur Nekrose kommt. $\text{TNF}\alpha$ scheint aber auch direkt Entzündungsvorgänge und Nekrose zu induzieren (vgl. Kap. 2.3.3). Imexon bewirkte

auch zu diesem Zeitpunkt eine Abschwächung der GalN/LPS-induzierten Leberschädigung mit starker Streubreite, ohne allerdings den Übergang von Apoptosen in Nekrosen zu beeinflussen.

Abweichend davon traten in der Dexamethason-Gruppe jetzt häufiger, bei Einzeltieren sogar deutlich vermehrt Apoptosen auf. Daneben waren auch Einzelzellnekrosen und vereinzelt sehr eng umschriebene Nekroseherde zu finden. Das Auftreten apoptotischer Zelluntergänge war demnach unter dem Einfluss von Dexamethason etwas abgeschwächt und zeitlich verschoben, was jedoch weder zu diesem noch zu einem späteren Zeitpunkt bis zur zweiundsiebzigsten Stunde post injectionem (Deschl 1999) mit einer Störung des Allgemeinbefindens einherging. Die Vorbehandlung mit Dexamethason bewirkt neben einer teilweisen Hemmung des Anstieges des TNF α -Serum-Spiegels auch eine leichte Verzögerung des TNF α -Peaks (Libert et al. 1991); möglicherweise steht die verspätete Apoptose-Induktion damit in Zusammenhang. Alternativ könnte Dexamethason als synthetisches Glukokortikoid selbst an der Induktion der Apoptosen beteiligt sein. Bei Lymphozyten z.B. ist Glukokortikoid-induzierte Apoptose bekannt (Zacharchuk et al. 1990, Garvy et al. 1993, Walker et al. 1995). Im Zusammenhang mit TNF α -induzierter Apoptose bei verschiedenen Zelllinien und spontaner bzw. TGF β -induzierter Apoptose bei Hepatozyten bewirkten Glukokortikoide zwar eine Apoptosehemmung (Yamamoto et al. 1998), gleichzeitig konnte aber unter dem Einfluss von Dexamethason eine Erhöhung der FASL-Expression auf Hepatozyten nachgewiesen werden (Müschen et al. 1998). Die zeitlich gestaffelte Expressionsänderung des FAS- bzw. FASL-Antigens scheint auch bei LPS-induzierten Zelluntergängen eine Rolle zu spielen (Müschen et al. 1998). Möglicherweise führt die Dexamethason-bedingte Veränderung der Expression dieser Apoptoseproteine in Verbindung mit der durch GalN veränderten Stoffwechsellage und Syntheseleistung der Hepatozyten (Decker und Keppler 1974, Tsutsui et al. 1997) zu diesem Zeitpunkt zu einem verstärkten Zelluntergang. Für einen anderen Apoptosemechanismus evtl. unter Beteiligung des FAS-Antigens würde auch die fehlende Granulozytensequestrierung in der Dexamethason-Gruppe zu diesem Zeitpunkt sprechen (Lawson et al. 1998, vgl. auch Kap. 5.3.1.2 und Kap. 2.3.3).

5.3.1 Immunhistologie

5.3.1.1 Apoptotisch veränderte Zellen

Der immunhistologische Nachweis apoptotischer Zellen in der Leber erfolgt über die Markierung charakteristischer DNA-Bruchstücke mit Hilfe der TUNEL-Reaktion (TdT-mediated dUtp nick end labeling). Obwohl die DNA-Fragmentierung im Ablauf der Apoptose eine sekundäre Veränderung ist und auch apoptotische Vorgänge ohne DNA-Fragmentierung

beschrieben wurden (Oberhammer et al. 1993, Klaus et al. 1996), ist der Test für den Nachweis von Apoptosen in diesem Modell geeignet, da im Verlauf der Apoptose bei Hepatozyten nach GalN/LPS-Stimulation charakteristische DNA-Bruchstücke entstehen (Leist et al. 1995a). Die Darstellung apoptotischer Zellen mit Hilfe der TUNEL-Reaktion bestätigte die Befunderhebung in der H.E.-Färbung. Die selektiv gefärbten DNA-Bruchstücke apoptotischer Zellen oder Zellreste stimmten in Verteilung und Morphologie mit den in der H.E.-Färbung als Apoptosen angesprochenen Strukturen überein. Bei den Tieren der 24 h-Gruppen kam es in stark nekrotischen Gebieten auch zu einer schwachen Reaktion. Die Färbung dieser Strukturen war sehr blass und zeigte keinerlei morphologische Ähnlichkeit mit Apoptosen, es war daher eine klare Abgrenzung gegen apoptotische Zellen möglich. Eine Färbung stark nekrotischer Veränderungen mit dem TUNEL-Test ist von Bohlinger et al. (1996) beschrieben worden. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass eine vergleichbare DNA-Fragmentierung stellenweise auch bei nekrotischen Zelluntergängen auftreten kann (Grasl-Kraupp et al. 1995, Bohlinger et al. 1996). Vermutlich handelt es sich im vorliegenden Versuch jedoch um eine unspezifische, da sehr schwache und nicht auf den Zellkern begrenzte Anfärbung hyaliner Strukturen in den stark nekrotischen Bereichen. Demgegenüber zeigten die als Apoptosen angesprochenen Zellen der Dexamethason-Gruppe nach vierundzwanzig Stunden eine deutliche und in der Morphologie charakteristische Anfärbung mit dem TUNEL-Test.

5.3.1.2 Granulozyten (MAC-1)

Den neutrophilen Granulozyten wird eine ursächliche Beteiligung bei der Pathogenese der GalN/LPS-induzierten Leberschädigung zugesprochen. Die Akkumulation von Granulozyten in der Leber nach Stimulation mit GalN/LPS verläuft, beginnend mit der zweiten Stunde post injectionem, progressiv (Jaeschke et al. 1990). Die Extravasation der Zellen beginnt zeitlich vor der Erhöhung der Transaminasen im Serum (Jaeschke et al. 1991), d.h. eine Gewebsschädigung, angezeigt durch das Austreten hepatozellulärer Enzyme, tritt erst nach der Infiltration von Granulozyten ein. Die Bedeutung dieser Zellen bei der Entstehung der Leberveränderungen wurde direkt nachgewiesen in Untersuchungen, in denen durch Hemmung der Granulozytenadhäsion an den Sinusoidendothelien mittels der Blockierung des Leukozytenadhäsionsmoleküls CD11/CD18 mit dem Antikörper MAC-1 (Jaeschke et al. 1990, 1991) bzw. durch Depletion der Granulozyten mittels Antiserum (Komatsu et al. 1994) die GalN/LPS-induzierte Leberschädigung deutlich verringert werden konnte. Allerdings wird vermutet, dass die Granulozyten v.a. sekundär die durch $\text{TNF}\alpha$ direkt induzierte Leberschädigung verstärken (Schlayer et al. 1989), da es auch ohne die Beteiligung von Granulozyten zur Leberschädigung kommen kann. Schlayer et al. (1989) fanden z.B. bei hohen Dosen $\text{TNF}\alpha$ eine Leberschädigung, obwohl der Granulozyten-Influx gehemmt war; in vitro konnte bei Hepato-

zyten durch Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ bei gleichzeitiger Transkriptionshemmung Apoptose unabhängig von der Anwesenheit nicht-parenchymaler Zellen induziert werden (Leist et al. 1994) und bei Mäusen mit genetischem Defekt des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 konnte mit einer Kombination von GalN/LPS eine Leberschädigung hervorgerufen werden (Xu et al. 1994).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte sieben Stunden nach Stimulation mit GalN/LPS eine deutliche Zunahme der Granulozyten in der Leber beobachtet werden. Sie konzentrierten sich in den Sinusoiden teilweise in Form von Granulozyten-Sticking oder infiltrierten unter Bildung lockerer Ansammlungen die stärker geschädigten Bereiche. Auch in der Vergleichsgruppe, nach Stimulation mit LPS alleine, war die Zahl der Granulozyten in der Leber geringgradig erhöht, trotzdem traten in dieser Gruppe keine apoptotischen und nekrotischen Gewebsveränderungen auf. In der Literatur wird auch nach Stimulation mit LPS alleine ein Anstieg des $\text{TNF}\alpha$ -Serumspiegels beschrieben (Libert et al. 1991, Essani et al. 1995, Leist et al. 1995a). $\text{TNF}\alpha$ aber ist ursächlich u.a. durch Erhöhung der MAC-1- und ICAM-1-Expression an der Adhärenz und Extravasation der Granulozyten beteiligt (Essani et al. 1995, Jones et al. 1999). Dies würde die Akkumulation von Granulozyten in der Vergleichsgruppe-LPS erklären. Essani et al. (1995) gelang es mit Hilfe einer FACS-Analyse, eine Erhöhung der MAC-1-Expression auf Granulozyten nach LPS-Stimulation direkt nachzuweisen. Die Kombination mit GalN verstärkte diesen Effekt noch, während nach der Verabreichung von GalN alleine weder eine Erhöhung des $\text{TNF}\alpha$ -Serumspiegels noch eine Erhöhung der MAC-1-Expression auf Granulozyten nachgewiesen werden konnte (Essani et al. 1995). Eine Hochregulierung der MAC-1-Expression bei Granulozyten war in der vorliegenden Arbeit bei Beurteilung im Lichtmikroskop aufgrund der sehr starken Anfärbung aller Granulozyten nicht zu erkennen. Aber die Ergebnisse von Essani et al. (1995) über das Ausbleiben einer Wirkung von GalN alleine konnten bestätigt werden; GalN ohne LPS verursachte keine Erhöhung der Granulozytenzahl in der Leber. Bei niedrigen LPS-Dosierungen kommt es nur durch Stimulation mit einer Kombination von LPS und GalN nach der Sequestrierung von Granulozyten in den Lebersinusoiden auch zur Einwanderung ins Gewebe und nur durch den direkten Kontakt von Granulozyten und Hepatozyten nachfolgend auch zur Gewebsschädigung (Schlayer et al. 1989, Chosay et al. 1997, Lawson et al. 1998, Jones et al. 1999). Neben der extremen Apoptoseinzidenz (Leist et al. 1995a) scheinen hierbei auch andere Faktoren eine Rolle zu spielen, so verursacht z.B. FAS-induzierte Apoptose von Leberzellen keine Granulozytensequestrierung (Lawson et al. 1998). Es gibt Hinweise, dass GalN auch einen direkten Einfluss auf die Granulozytenakkumulation in der Leber hat. Hepatozyten sollen unter dem Einfluss von GalN chemotaktische Stoffe bilden können (Shiratori et al. 1992, Essani et al. 1995) und Akut-Phase-Proteine, deren Bildung durch GalN reduziert wird, wirken dem Granulozyten-Influx entgegen (Schlayer et al. 1989, Alcorn et al. 1992).

Die vorbeugende Behandlung mit Imexon führte zu einer zusätzlichen, wenn auch geringgradigen Verstärkung des Granulozyten-Influx. Dieser Anstieg der Granulozytenzahl könnte durch die im Durchschnitt etwas stärkere Erhöhung des TNF α -Serumspiegels unter Einwirkung dieser Substanz bedingt sein. Die Stärke der Granulozyteninfiltration in veränderte Gewebareale hingegen entsprach der Ausdehnung dieser veränderten Bereiche und war damit deutlich geringer ausgeprägt als in der LPS-Gruppe. Granulozyten-Sticking in den Sinusoiden trat häufiger auf, d.h. die Zahl der Granulozyten, die sich an die Gefäßwände in der Leber anheften war größer als in der LPS-Gruppe, es kam aber seltener zur Infiltration. Eine mögliche Erklärung wäre eine substanzbedingte teilweise Hemmung der Extravasation von Granulozyten, aber unter Voraussetzung der Annahme, dass die Granulozyten aufgrund der GalN/LPS-induzierten Vorschädigung der Leber aus den Sinusoiden auswandern (Schlayer et al. 1989, siehe auch oben), lässt sich vermuten, dass aufgrund geringerer Zellschädigungen in dieser Gruppe auch weniger Granulozyten aus den Gefäßen auswandern. Die Beeinflussung des Verhalten der Granulozyten im GalN/LPS-Modell durch Imexon scheint somit eher sekundär zu sein.

Bei der Dexamethason-Gruppe entsprach die Granulozytenzahl im Durchschnitt der der LPS-Gruppe. Die Granulozyten waren aber vermehrt innerhalb der Gefäße lokalisiert. Auch das Granulozyten-Sticking trat gehäuft auf, d.h. unter dem Einfluss von Dexamethason schien nicht die Adhäsion, wohl aber die Auswanderung aus den Gefäßen gehemmt zu sein. Bei der Verstärkung der Granulozytenadhäsion im GalN/LPS-Modell sind neben TNF α auch andere Zytokine, z.B. IL1, beteiligt (Essani et al. 1995). IL1 führt in Verbindung mit GalN zwar zu einer vergleichbaren Granulozytenakkumulation, eine Leberschädigung wird aber nur durch die Kombination GalN/TNF α ausgelöst (Essani et al. 1995). Der Anstieg des TNF α -Serumspiegels war in der Dexamethason-Gruppe in der vorliegenden Arbeit deutlich gehemmt. IL 1 hingegen soll durch Dexamethason weniger stark gehemmt werden als TNF α (Chensue et al. 1991), was die verstärkte Adhäsion bei gleichzeitiger Hemmung der Auswanderung unter dem Einfluss von Dexamethason erklären könnte. Daneben könnte die geringere Infiltrationsrate auch durch die sehr geringe Zahl an Zelluntergängen mit bedingt sein.

Vierundzwanzig Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS war bei allen Tieren, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit in den Bereichen zusammenhängender Nekrosen eine extrem starke Konzentrierung von Granulozyten zu beobachten. Ein vergleichbares histopathologisches Bild wird von Shiratori et al. (1990a/b) vierundzwanzig Stunden nach dem Transfer von LPS-stimulierten Makrophagen in GalN-sensibilisierte Mäuse beschrieben. In denselben Versuchen wurde eine Beteiligung freier Sauerstoffradikale an der Entstehung der Veränderungen nachgewiesen (Shiratori et al. 1990a, 1990b) und damit ein Hinweis auf die Bedeutung nicht-parenchymaler Zellen für die Gewebsschädigung zu diesem Zeitpunkt erbracht. In einem anderen Modell, das in vitro die Verhältnisse einer fortgeschrittenen

Lebernekrose widerspiegelt, konnte die Bedeutung der Granulozyten für die Toxizität von LPS bei direktem Kontakt zwischen Granulozyten und Hepatozyten belegt werden (Sauer et al. 1996), d.h. zu diesem Zeitpunkt kommt es unter Beteiligung von Makrophagen und Granulozyten vermehrt zu nekrotischen Zelluntergängen und Abräumreaktionen in den betroffenen Gebieten. Im vorliegenden Versuch traten in der Imexon- und in der Dexamethason-Gruppe dichte Anlagerungen von Granulozyten auch um Einzelzellnekrosen auf. Demgegenüber waren die nicht von Nekrosen betroffenen Areale weitestgehend frei von Granulozyten. Granulozyten-Sticking wurde zu diesem Zeitpunkt in keiner Gruppe gefunden. Die Gesamtzahl der Granulozyten im Lebergewebe nach vierundzwanzig Stunden korrelierte mit der Stärke der nekrotischen Veränderungen in der jeweiligen Gruppe.

5.3.1.3 Makrophagen (MAC-1, F4/80)

Makrophagen werden als eine der Hauptquellen für die Bildung und Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ nach LPS-Stimulus angesehen (Beutler und Cerami 1988). Bei Kupfferzellen kann nach Stimulation mit LPS eine Verstärkung der $\text{TNF}\alpha$ -Expression nachgewiesen werden (Chensue et al. 1991) und eine selektive Depletion der Kupfferzellen führte zu einer Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Bildung in der Leber (Luster et al. 1994, Salkowski et al. 1995). Kupfferzellen sind somit an der Bildung eines der Hauptmediatoren der GalN/LPS-Hepatitis beteiligt. Leist et al. (1994) konnten aber zeigen, dass für die nachfolgende Induktion von Apoptose in Leberzellen durch $\text{TNF}\alpha$ in vitro die Anwesenheit von nicht-parenchymalen Zellen nicht notwendig ist.

In der vorliegenden Arbeit waren Zahl und Verteilungsmuster der Kupfferzellen sieben Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS in allen Gruppen bei beiden Markern nicht erkennbar verändert. Deutlich hingegen waren die Unterschiede in der Morphologie der Makrophagen. In der LPS-Gruppe waren fast alle markierten Zellen vergrößert und abgerundet; sie zeigten deutliche Anzeichen von Phagozytose. Bei Tieren, die mit Imexon vorbehandelt waren, war die Mehrzahl der Kupfferzellen vergrößert, jedoch weniger stark als in der scheinbehandelten Gruppe. Auch die stärker vergrößerten Zellen waren weniger abgerundet. Die Abrundung schien unter Substanz Einfluss stärker gehemmt zu sein als die Größenzunahme, was auf die Beeinflussung der Makrophagen durch Imexon (siehe unten) hinweisen könnte. In der Dexamethason-Gruppe weichen die Zellen in Größe und Morphologie nur wenig von denen der Kontrolltiere ab. Die Größe der Zellen veränderte sich bei der jeweiligen Gruppe entsprechend dem Ausmaß der Gewebsschädigung.

Vierundzwanzig Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS waren bei allen Gruppen, auch bei dem betroffenen Tier der Dexamethason-Gruppe, die Makrophagen in den Bereichen zusammenhängender Nekrose extrem vergrößert und zeigten ausgeprägte Phagozytoseaktivi-

tät, während sie in der LPS- und der Imexon-Gruppe in weniger betroffenen Gebieten und zur Läppchenperipherie hin zunehmend kleiner und schlanker waren. Zahl und Lokalisation der vergrößerten Zellen entsprachen dem Auftreten der Gewebsschädigungen, was auf eine Beteiligung an den Abräumreaktionen in veränderten Gebieten schließen lässt. Nach prophylaktischer Behandlung mit Dexamethason ähnelte das Bild außerhalb der Nekroseherde dem der 7 h-LPS-Gruppe. Fast alle Makrophagen waren jetzt vergrößert und abgerundet, unabhängig von ihrer Lokalisation. Die Entsprechung der morphologischen Veränderungen der Zellen nach sieben Stunden in der LPS- und der Imexon-Gruppe und nach vierundzwanzig Stunden in der Dexamethason-Gruppe lässt einen Zusammenhang mit den gleichzeitig auftretenden Apoptosen vermuten.

In Bezug auf die Expression der markierten Antigene deutete sich bei dem Antigen MAC-1 nach sieben Stunden gegenüber der sehr schwachen Expression der Kontrollgruppe eine leichte Hochregulierung an, die in der Imexon-Gruppe etwas deutlicher ausgeprägt war als in den beiden anderen Therapiegruppen.

Die MAC-1-Expression verschiedener Makrophagenpopulationen unterscheidet sich je nach Differenzierungsgrad und Lokalisation (Springer et al. 1979). Peritonealmakrophagen exprimieren das Antigen sehr stark, Milzmakrophagen etwas schwächer (Ho und Springer 1982). Bei unstimulierten Kupfferzellen wird die Expression des Antigens als äußerst schwach beschrieben (Ho und Springer 1982, Matsumoto 1985). Das mit dem Antikörper MAC-1 markierte Antigen ist ein Rezeptor für das Komplementabbauprodukt C3b (Beller et al. 1982). Dieser Rezeptor ist an der Gefäßmarginierung durch Adhäsion und der Diapedese von Granulozyten und Monozyten beteiligt (Springer und Anderson 1986). Bei Peritonealmakrophagen wurde nach Stimulation mit LPS keine MAC-1-Hochregulierung festgestellt (Ho und Springer 1982). Essani et al. (1995) wiesen aber bei Granulozyten eine Verstärkung der MAC-1-Expression bis zu sieben Stunden nach Stimulation mit GalN/LPS bzw. $\text{TNF}\alpha$ /GalN nach. Entsprechend wäre eine Erhöhung der Antigenexpression auf Zellen der Makrophagen-Monozytenlinie zu diesem Zeitpunkt als analoge Reaktion auf den GalN/LPS-Stimulus bzw. den Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration interpretierbar. Die zusätzliche leichte Verstärkung der MAC-1-Expression in der Imexon-Gruppe könnte als Zeichen für eine stärkere Aktivierung der Makrophagen gewertet werden. Die Aktivierung von Makrophagen ist als eine Wirkung von Imexon in verschiedenen Untersuchungen über die immunologische und Antitumor-Wirkung dieser Substanz beschrieben worden (Gamsa 1975, Bicker und Hebold 1977b, Bonfert et al. 1977).

Nach vierundzwanzig Stunden war die Expression des MAC-1-Antigens aller Makrophagen in der Leber bei allen Gruppen deutlich hochreguliert. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass auch durch Stimulation mit chemotaktischen Stoffen bei Granulozyten und bei Monozyten eine deutliche Hochregulierung der MAC-1-Expression beobachtet wurde (Springer

et al. 1984, Springer und Anderson 1986). Daneben spielt das Antigen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose opsonierter Partikel (Springer und Anderson 1986). Aufgrund der Zelluntergänge freiwerdende Substanzen und die verstärkte Phagozytoseaktivität der Makrophagen bei den Abräumreaktionen in den geschädigten Gebieten könnten die weitere Hochregulierung des MAC-1-Antigens auf der Oberfläche beteiligter Makrophagen bewirken, die in der vorliegenden Arbeit vierundzwanzig Stunden nach GalN/LPS-Stimulus in allen Gruppen auftrat. Die Verstärkung der Expression von MAC-1 bei Makrophagen wurde von der zeitlichen Verschiebung im Auftreten der Apoptosen in der Dexamethason-Gruppe nicht beeinflusst.

Die F4/80-Expression war in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zur MAC-1-Expression unverändert bzw. in den stark nekrotischen Bereichen bei den 24 h-Gruppen sogar extrem abgeschwächt. F4/80 ist ein Makrophagenmarker, der mit der Reifung der Zellen zunimmt (Austy und Gordon 1981). Die Antigenexpression ändert sich z.B. bei Adhäsion der Zellen oder Änderung des Aktivierungszustandes (Springer et al. 1978). Nach Aktivierung mit Thio-glykolat und BCG sinkt die F4/80-Expression auf Peritonealmakrophagen (Springer et al. 1978, Austy und Gordon 1981). Andererseits konnte bei Mäusen im Rahmen einer experimentellen Malariainfektion eine Hochregulierung des Antigens bei Makrophagen in Leber und Milz festgestellt werden (Lee et al. 1986) und nach Injektion von BCG kam es in Granulomen und abführenden Lymphknoten zu einer verstärkten Expression (Hume et al. 1983). Eine klare Zuordnung einer Funktion für das Antigen ist bislang noch nicht gefunden worden. Neuere Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung an Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen immunologischer Reaktionen und der Retention von Abwehrzellen in bestimmten Geweben hin (vgl. Kap. 2.5.2.2). Die veränderte Expression in den nekrotischen Gebieten könnte ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des F4/80-Antigens an der Reaktion von Makrophagen auf aktivierende Stimuli sein.

Weder Imexon noch Dexamethason veränderten die Expression des F4/80-Antigens bei Kupfferzellen.

5.3.2 Transaminasen

Der Anstieg der Transaminasen im Serum nach Stimulation mit GalN/LPS wird gemeinhin als Gradmesser für die Leberschädigung verwendet (Chojkier und Fierer 1985, Wendel 1990).

Im vorliegenden Versuch verlief der Anstieg des Serumspiegels der Aminotransferasen ASAT und ALAT bei allen Tieren parallel. Der ALAT-Spiegel aber war v.a. bei den 24 h-Gruppen deutlich stärker angestiegen als der ASAT-Spiegel. Der Anstieg der Transaminasen im Serum korrelierte weitestgehend mit der histologisch festgestellten Schwere der Leberschädigung

auch im Hinblick auf die Befunde der Einzeltiere. Obwohl das Ausmaß der Nekrosen die Erhöhung der Serumtransaminase-Spiegel stärker zu beeinflussen schien als das Ausmaß der apoptotischen Veränderungen, kam es bereits nach sieben Stunden zu einem deutlichen Anstieg der Transaminasen im Serum. Das Freiwerden von Leberenzymen bei starker Häufung apoptotischer Zelluntergänge wird auch in der Literatur beschrieben und darauf zurückgeführt, dass bei gehäuftem Zerfall von Zellen aus apoptotischen Fragmenten vor der Phagozytose durch andere Zellen Zytoplasmabestandteile austreten können (Oberhammer et al. 1993). Gleichzeitig beginnt zu diesem Zeitpunkt auch die Infiltration von Granulozyten in das Lebergewebe. Diese verursachen eine zusätzliche Schädigung von Leberzellen (vgl. Kap. 5.3.1.2), was die apoptotische Schädigung in eine nekrotische übergehen lässt.

Unter dem Einfluss von Imexon war in der vorliegenden Arbeit sieben und vierundzwanzig Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS der Anstieg der Transaminasen im Mittel geringer ausgeprägt als in den LPS-Gruppen. Aber wie bei der histopathologischen Auswertung traten in beiden Gruppen deutliche individuelle Schwankungen auf, die zur Überschneidung der Wertebereiche führten, so dass sich für die Abweichung keine Signifikanz ergab.

Für Dexamethason hingegen konnte die signifikante Hemmung der Leberschädigung auch auf Basis des Serumspiegels der Transaminasen bestätigt werden.

5.4 TNF α

TNF α wird als einer der Hauptmediatoren bei der GalN/LPS-Hepatitis angesehen (Tiegs et al. 1989). Durch eine Kombination von GalN mit TNF α können ebenso eine Hepatitis und Leberzellapoptose ausgelöst werden wie durch GalN/LPS (Tiegs et al. 1989, Leist et al. 1994). Außerdem schützt eine passive Immunisierung mit TNF α -Antikörpern vor der letalen Wirkung von LPS (Beutler et al. 1985). Der TNF α -Serumspiegel steigt bereits 30-45 min nach LPS-Stimulation deutlich an, erreicht nach einer Stunde sein Maximum und fällt bis zur vierten Stunde post injectionem wieder unter die Nachweisgrenze ab (Zuckerman et al. 1989, Chensue et al. 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumwerte von TNF α zwei Stunden nach Stimulation mit GalN/LPS bestimmt. Sie waren stark angestiegen (im Mittel bei 1161 bzw. 1202 pg/ ml), wiesen aber auch eine enorme Streuung auf (509 bis 2657 pg/ ml). Ähnlich starke Abweichungen vom Mittelwert nach Stimulation mit GalN/LPS sind z.B. auch von Solorzano et al. (1997) dokumentiert.

Die große Schwankungsbreite im Grad der Leberschädigung, die bei diesem Modell immer wieder beschrieben wurde, wird in erster Linie auf Unterschiede in der Reaktionsbereitschaft

von Zellen des Immunsystems zurückgeführt (Groeneveld et al. 1988, Shiratori et al. 1988, Wendel 1990). Diese werden auch als Quelle für die Bildung von TNF α angesehen (Beutler und Cerami 1988, Bette et al. 1993, Salkowski et al. 1995). Schwankungen des TNF α -Spiegels könnten entsprechend auf diese unterschiedliche Reaktionsbereitschaft zurückzuführen sein.

Der Anstieg des TNF α -Serumspiegels scheint allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit der Leberschädigung zu stehen. Solorzano et al. (1997) konnten zeigen, dass der Anstieg des TNF α -Spiegels im Blut im GalN/LPS-Modell v.a. für die Letalität von Bedeutung ist, während der Grad der Leberschädigung vom Vorhandensein von zellassoziertem TNF α abhängt. Es wurde vermutet, dass Zytokinserumspiegel den überschüssigen Anteil lokal gebildeter Zytokine darstellen (Luster et al. 1994, Salkowski et al. 1995). Vergleichende Untersuchungen der TNF α -Konzentration nach Endotoxinstimulation in Bauchhöhle bzw. Leber und Blut deuten aber darauf hin, dass es sich um von einander unabhängige Kompartimente mit unterschiedlichen TNF α -Quellen handelt (Hoffmann et al. 1994, Salkowski et al. 1995). Während in der Leber 50-75 % der TNF α -Bildung von Gewebsmakrophagen abhängig zu sein scheint, kommen im Blut v.a. zirkulierende Zellen wie Monozyten, Granulozyten oder Lymphozyten als TNF α -Quelle in Frage (Salkowski et al. 1995), wobei die Beteiligung eines lokalen TNF α -Überschusses aus anderer Quelle, z.B. der Milz, wo u.a. dendritische Zellen an der Bildung von TNF α beteiligt sein sollen (Bette et al. 1993), nicht ausgeschlossen werden kann. Der Anstieg der TNF α -Serumwerte korrelierte auch im vorliegenden Versuch nicht mit dem Anstieg der Transaminasen bei den einzelnen Tieren, was die Untersuchungen über die Bedeutung lokaler TNF α -Konzentrationen bestätigt.

Nach Vorbehandlung mit Imexon lagen die TNF α -Serumwerte bei einzelnen Tieren weit über dem höchsten Wert in der LPS-Gruppe. Es wurden Werte von bis zu 13061 pg/ml erreicht. Durch Überschneidungen der Wertebereiche ergab sich aber auch für diese Abweichung keine Signifikanz. Die vergrößerte Streuung unter dem Einfluss von Imexon ist vermutlich wie die Schwankung der Leberschädigung auf eine unterschiedliche immunologische Reaktionsbereitschaft der Einzeltiere zurückzuführen (siehe oben). Die Imexon-Wirkung wurde im vorliegenden Versuch offensichtlich nicht wie die Dexamethason-Wirkung (siehe unten) über eine Hemmung des Hauptmediators TNF α vermittelt. Es trat im Gegenteil bei manchen Tieren sogar eine zusätzliche Erhöhung des TNF α -Serumspiegels ein, die allerdings keinerlei Auswirkung auf den weiteren Krankheitsverlauf hatte. Eine Reduktion der Leberschädigung im GalN/LPS-Modell ohne Beeinflussung des TNF α -Serumspiegels ist z.B. für das immunmodulierende und kanzerostatisch wirkende Antibiotikum Novobiocin beschrieben (Lührmann et al. 1998). Dessen Wirkung beruht vermutlich auf einer Hemmung der ADP-Ribosylierung, die wiederum an der Regulierung der Expression verschiedener immunologisch aktiver Oberflächenmoleküle beteiligt ist (Heine et al. 1995, Lührmann et al. 1998). Ferner ist

eine schützende Wirkung im GalN/LPS-Modell auch bei Substanzen beschrieben worden, die in Zellen eine Glutathion-Entscheidung hervorrufen, z.B. Diethylmaleat (DEM), wobei bei dieser Substanz neben der Hemmung des TNF α -Anstiegs und der Endothelaktivierung eine direkte Beeinflussung der Apoptoseneigung von Hepatozyten auf Ebene einer Redox-Manipulation nachgewiesen wurde (Jones et al. 1999). Auch Untersuchungen über die Beteiligung von Sauerstoffradikalen an der LPS- bzw. TNF α -induzierten Apoptose von Hepatozyten weisen auf die Bedeutung des Gleichgewichts verschiedener Radikale für die Apoptoseneigung der Leberzellen hin (Wang et al. 1998). Bei Myelomzellen ist für Imexon eine Bindung an Thiole und die Induktion von oxidativem Stress nachgewiesen worden (Dvorakova et al. 2000), so dass eine direkte Beeinflussung der Apoptose auf dieser Ebene ebenfalls denkbar wäre. Die Wirkung von TNF α kann aber auch auf verschiedenen anderen Ebenen gesteuert werden. Neben einer Regulation über Zytokinrezeptoren (De Kossodo et al. 1994, Jilg et al. 1996) wird z.B. bei Makrophagen eine Verstärkung der TNF α -Wirkung durch eine Erhöhung des intrazellulären c-AMP-Spiegels beschrieben (Lehmann et al. 1988). Bei Untersuchungen der Makrophagenaktivierung durch Imexon ist ein Abfall des c-AMP-Spiegels gefunden worden (Bicker und Hebold 1977b), so dass hier ein Zusammenhang mit einer Abschwächung der TNF α -Wirkung in Bezug auf Makrophagen existieren könnte. Zur Klärung des Mechanismus der Imexon-Wirkung auf einer dieser Ebenen wären weitergehende Untersuchungen erforderlich.

Unter dem Einfluss von Dexamethason trat bei allen Tieren eine deutliche Hemmung des Anstiegs der TNF α -Serumwerte mit nur geringer Schwankungsbreite ein. Die schützende Wirkung von Dexamethason im GalN/LPS-Hepatitis-Modell (Tiegs et al. 1989) wird v.a. auf die Hemmung der TNF α -Ausschüttung durch Makrophagen und des Anstiegs des TNF α -Serumspiegels zurückgeführt (Waage 1987, Remick et al. 1989, Chensue et al. 1991, Libert et al. 1991). Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden.

5.5 FACS-Analyse des Blutes

5.5.1 Leukozyten

Bei der FACS-Analyse der weißen Blutzellen ergaben sich in der vorliegenden Arbeit bei keiner der Gruppen signifikante Unterschiede in der Zahl der Monozyten.

Der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den weißen Blutzellen war in der LPS-Gruppe sieben und vierundzwanzig Stunden nach Verabreichung von GalN/LPS gegenüber den Kontrollgruppen im Mittel signifikant um 35,3 % (7 h) bzw. 24,1 % (24 h) erniedrigt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nach Stimulation mit GalN/LPS eine Verschiebung des

Verhältnisses der Lymphozyten zu Granulozyten zugunsten der Granulozyten eintritt. In der Literatur wird Neutropenie durch Marginierung und Auswanderung von neutrophilen Granulozyten als eine Wirkung von LPS auf das Differentialblutbild beschrieben (Wilson 1985). Gleichzeitig fanden Zuckerman und Bendele (1989) sechs Stunden nach LPS-Injektion eine noch stärkere Lymphopenie. Diese Abnahme der Lymphozyten konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Verschiebung des Verhältnisses beider Zellpopulationen zueinander indirekt bestätigt werden.

Imexon hatte zu keiner Zeit einen Einfluss auf diese GalN/LPS-bedingte Erniedrigung des prozentualen Anteils der Lymphozyten. Es kam aber wie auch bei vielen anderen Parametern (vgl. Kap. 5.3.1, Kap. 5.3.2, Kap. 5.4) zu einer noch breiteren Streuung der Einzeltierwerte. Untersuchungen des Differentialblutbildes nach der Stimulation mit GalN/LPS ergaben auch unter Behandlung mit Imexon nach sechs Stunden eine geringgradige Neutrophilie (vgl. auch nächster Absatz), die bis zur zehnten Stunde weiter zunahm (Deschl 1999). In der vorliegenden Untersuchung war diese Tendenz in der FACS-Analyse nicht zu erkennen, wobei eine sichere Aussage über die absolute Zahl der Granulozyten nur anhand der prozentualen Verhältnisse der Zellpopulationen in der FACS-Analyse nicht möglich ist und die starke Streuung der Werte auch eine tendenzielle Beurteilung zusätzlich erschwert.

Nach vorbeugender Behandlung mit Dexamethason war der prozentuale Anteil der Lymphozyten nach sieben Stunden gegenüber der LPS-Gruppe nochmals signifikant um 41,5 % reduziert. Eine Leukozytose bei gleichzeitiger Abnahme des Lymphozytenanteils als Veränderung des Differentialblutbildes ist im Rahmen des Adaptationssyndroms unter Beteiligung von Kortikoiden als Stressauswirkung bekannt (Hoff 1957). Gleichartige Verschiebungen wurden z.B. auch bei Untersuchungen der Veränderungen des Differentialblutbildes beim Schocksyndrom im Verlauf einer Pansenazidose von Hartig (1975) beschrieben. Bei Untersuchungen zum LPS-induzierten Schock trat nach zusätzlicher Verabreichung von Dexamethason nach sechs Stunden eine Neutrophilie bei gleichzeitiger Lymphopenie auf (Zuckerman und Bendele 1989). Beide Veränderungen des Differentialblutbildes könnten auch im vorliegenden Versuch das Verhältnis der Zellpopulationen zueinander noch weiter in Richtung Granulozyten bewegt haben. Nach vierundzwanzig Stunden hat sich in der Dexamethason-Gruppe das Verhältnis zugunsten der Lymphozyten verschoben. Es kam zu einer nicht signifikanten Erhöhung des Lymphozytenanteiles um 19,1 %. Untersuchungen des Differentialblutbildes im Verlauf der GalN/LPS-Hepatitis nach Dexamethason-Behandlung zu einem späteren Zeitpunkt (Deschl 1999) weisen darauf hin, dass an dieser Verschiebung beide Zellpopulationen beteiligt sind.

5.5.2 B- und T-Lymphozyten (B220, CD3)

Die Veränderung des prozentualen Anteils der B- und T-Lymphozyten an den weißen Blutzellen entsprach der Veränderung des Anteils der Gesamtlmphozyten an den weißen Blutzellen, d.h. der Anteil beider Zellpopulationen war nach Stimulation mit GalN/LPS erniedrigt. Dexamethason führte nach sieben Stunden zu einer noch weitergehenden Erniedrigung, nach vierundzwanzig Stunden war eine Tendenz zur Erhöhung erkennbar, die jedoch nicht signifikant war (vgl. Kap. 5.5.1). Das Verhältnis von B- zu T-Lymphozyten entwickelte sich bei allen Gruppen etwas zugunsten der T-Zellen. Diese tendenzielle Entwicklung ergab aber keine Signifikanz. Imexon beeinflusste diese GalN/LPS-induzierten Veränderungen nicht. Aber allein in der Imexon-Gruppe wurde nach sieben Stunden eine signifikante Erniedrigung der B220-CD3-doppelt-negativen Lymphozyten festgestellt. Zur Identifizierung dieser Zellen bzw. einer Beurteilung der Bedeutung dieser Veränderung wäre eine weitergehende Charakterisierung nötig, die im Rahmen dieser Untersuchung nicht erfolgen konnte.

5.6 Milz

Die Milz ist nach der Leber das Organ, das den größten Anteil von Lipopolysacchariden aus dem Blut aufnimmt (Freudenberg und Galanos 1990). Bei Untersuchungen an Leberzellkulturen und perfundierten Mäuselebern wurde trotz Sensibilisierung mit GalN keine verstärkte Toxizität von LPS, Leukotrienen oder $\text{TNF}\alpha$ festgestellt, was auf die Beteiligung extrahepatischer Faktoren bei der Entstehung der Leberschädigung schließen lässt (Wang und Wendel 1990, Wendel 1990). Auf verschiedenen Milzzellpopulationen wurden Rezeptoren für LPS nachgewiesen (Lei und Morrison 1988a). Bereits mit Dosierungen von 2 μg LPS pro Tier konnten Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der Milzkompartimente sowie eine Änderung des Phagozytoseverhaltens ausgelöst werden (Groeneveld und Van Rooijen 1984, Groeneveld et al. 1988). $\text{TNF}\alpha$, IL1 und IL6 sind ursächlich an der Vermittlung der toxischen Wirkung von GalN/LPS beteiligt (Lehmann et al. 1987, Dinarello 1989, Tiegs et al. 1989). Nach Stimulation mit LPS ist für alle drei Zytokine eine Erhöhung der Transkription (Salkowski et al. 1995) und der Expression in der Milz beschrieben worden (Duncan et al. 1991, Ulich et al. 1991, Zuckerman et al. 1991, Schöbitz et al. 1992, De Kossodo et al. 1994). Nach Splenektomie war der Anstieg des $\text{TNF}\alpha$ -Serumspiegels nach LPS-Stimulation reduziert (Suzuki et al. 1996). Durch den Transfer von Milzzellen konnten nicht nur LPS-resistente Tiere für GalN/LPS sensibilisiert werden (Chojkier und Fierer 1985, Freudenberg et al. 1986), sondern es gelang auch durch Übertragung von LPS-stimulierten Milzzellen auf GalN-sensibilisierte Mäuse eine Leberschädigung hervorzurufen (Shiratori et al. 1990). Nach vorangegangener Splenektomie war die GalN/LPS-induzierte Leberschädigung reduziert und die Mortalität sank (Shiratori et al. 1990a),

außerdem war der Anstieg des LDH-Serumspiegels und des Peroxid-Gehaltes der Leber gehemmt (Hiraoka et al. 1995). Gleiche Ergebnisse konnten auch durch eine Ligatur der Milzvene, der direkten Verbindung zwischen Milz und Leber, bei gleichzeitigem systemischen Shunt erzielt werden (Hiraoka et al. 1995). Durch Splenektomie wurde eine direkte Beteiligung der Milz an Zirkulationsstörungen im Rahmen einer Endotoxämie nachgewiesen. Über die Milz wird hierbei Flüssigkeit aus dem Blutkreislauf in Lymphgefäße abgeführt. Der damit verbundene Blutdruckabfall und Anstieg des Hämatokrits konnte durch Splenektomie verhindert werden (Andrew et al. 2000). All diese Untersuchungen weisen auf eine pathogenetische Beteiligung der Milz bei der Entstehung der GalN/LPS-induzierten Leberschädigung hin. Unklar bleibt, wie die Milz diese immunpathologischen Vorgänge beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden die GalN/LPS-induzierten Veränderungen der zellulären Zusammensetzung der Milz ohne Behandlung und nach vorbeugender Behandlung mit Imexon oder Dexamethason mit Hilfe einer FACS-Analyse sowie histopathologischer und immunhistologischer Untersuchungen beurteilt.

5.6.1 Milzgewichte/ FACS-Analyse der Milz

Die Milzgewichte unterlagen bei allen Gruppen, u.a. bedingt durch variierende Blutfülle, einer sehr starken Streuung. Weder nach Stimulation durch GalN/LPS noch unter Substanzeinfluss war eine deutliche Abweichung vom Durchschnittsgewicht der Kontrollen zu erkennen. Ergebnisse anderer Untersuchungen über eine Zunahme des Milzgewichtes durch LPS (Groeneveld und Van Rooijen 1984) bzw. GalN/LPS (Deschl 1999) konnten nicht bestätigt werden. Obwohl in der Imexon-Gruppe bei der vorliegenden Untersuchung die niedrigsten der gemessenen Werte auftraten, zeigten einzelne Tiere in dieser Gruppe auch extrem hohe Milzgewichte. Eine signifikante Abnahme des Milzgewichtes wie unter einer Langzeit-Therapie mit Imexon im MRL lpr/lpr-Modell (Steger 1993) trat im untersuchten Zeitraum nicht auf.

Ebenso wie für die Milzgewichte ergab sich auch für die Gesamtzellzahl der Milz eine extreme Streuungsbreite, weswegen bei den Ergebnissen der FACS-Analyse nur die relativen Zellverschiebungen verglichen werden konnten. Die bei der FACS-Analyse ermittelten Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellpopulationen in der Milz bestätigten die Ergebnisse der histopathologischen Auswertung. Sieben Stunden nach Stimulation mit GalN/LPS war bei den scheinbehandelten Tieren der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den weißen Blutzellen in der Milz zwar unverändert, der Anteil der T-Zellen an den Lymphozyten aber war signifikant erniedrigt, der der B-Zellen erhöht. Die histopathologische Auswertung in der vorliegenden Arbeit ergab eine Depletion der PALS durch GalN/LPS nach sieben Stunden. Es wurde zwar auch eine starke Depletion der B-Lymphozyten in der Marginalzone gefunden, diese ist aber auf eine Zellwanderung in die Follikel zurückzuführen (Groeneveld et al. 1985), so dass sich der Gesamtanteil der B-Lymphozyten in der Milz durch diese Verschiebung nicht veränderte.

Auf eine Abnahme der T-Zellzahl wird auch bei anderen Untersuchungen der Milz nach LPS-Stimulation hingewiesen (Groeneveld et al. 1986).

Nach vierundzwanzig Stunden war die Verschiebung innerhalb der Lymphozyten zwar noch in der Tendenz erkennbar, aber nicht mehr signifikant. Der prozentuale Anteil der Gesamtlmphozyten an den Gesamtleukozyten in der Milz jedoch war jetzt signifikant verringert, was bei unveränderten Monozytenzahlen und unter Berücksichtigung der histopathologischen Ergebnisse vermutlich in der Akkumulation von Granulozyten in der roten Pulpa zu diesem Zeitpunkt begründet ist. Auffällig war, dass unter Einfluss von Imexon eine signifikante Erniedrigung des Anteils der B220-CD3-doppelt-negativen Lymphozyten eintrat, die in der Milz im Gegensatz zu den Veränderungen im Blut (vgl. Kap. 5.5.2) vierundzwanzig Stunden nach Stimulation mit GalN/LPS im Durchschnitt noch verstärkt war. Dexamethason beeinflusste die GalN/LPS-induzierten Veränderungen nicht signifikant. Nach sieben Stunden deutete sich jedoch eine leichte Erniedrigung des Anteils der Gesamtlmphozyten an den Gesamtleukozyten der Milz in dieser Gruppe im Vergleich zu der scheinbehandelten Gruppe an, die die histologisch darstellbare Akkumulation von Granulozyten um die Marginalzone (vgl. Kap. 5.6.2.1.1.2) widerspiegeln könnte.

5.6.2 Histopathologie/Immunhistologie

5.6.2.1 Pathologisch-histologische Veränderungen im GalN/LPS-Modell nach sieben Stunden

5.6.2.1.1 Rote Pulpa

In der roten Pulpa kam es im vorliegenden Versuch unabhängig von der zusätzlichen Behandlung zu diesem Zeitpunkt zu einer starken Hyperämie und Erweiterung der Sinusoide.

5.6.2.1.1.1 Lymphozyten

Die Zahl der Lymphozyten war im gesamten Kompartiment deutlich reduziert, ausgenommen waren lediglich die Bereiche um die terminalen Arteriolen. Groeneveld et al. (1988) beschreiben vergleichbare Veränderungen nach vierundzwanzig Stunden, was möglicherweise auf eine stärkere Ausprägung und die spätere Rückbildung der LPS-induzierten Veränderungen bei der Verabreichung von hohen Dosen LPS ohne GalN zurückzuführen ist. Bei der immunhistologischen Untersuchung wurde deutlich, dass von der weitgehenden Depletion alle Lymphozytenpopulationen betroffen waren. Die Bedeutung der Lymphozyten in

der roten Pulpa ist nicht völlig geklärt (Van Rooijen et al. 1989c). Für verschiedene Leukozytenpopulationen konnte eine Retention gegenüber dem Blutfluss festgestellt werden, die vermutlich durch kurzfristige Adhärenz der Zellen an der Gefäßwand bzw. durch die Passage durch das retikuläre Netzwerk der roten Pulpa im Rahmen des offenen Milzkreislaufes bedingt ist (Strasser 1986a, Hogg 1995). Möglicherweise kommt es direkt als Reaktion auf die toxischen Wirkungen von GalN/LPS zur vermehrten Abwanderung der in der roten Pulpa retinierten Lymphozyten. Alternativ könnten auch die im Rahmen der Milzhyperämie veränderten hämodynamischen Verhältnisse oder die verstärkte Abführung von Blutflüssigkeit aus der Milz in die lienalen Lymphgefäße (Andrew et al. 2000) über eine vermehrte Ausschwemmung sowie die durch die Lymphopenie (vgl. Kap. 5.5.1) verringerte Zahl der die Milz passierenden Lymphozyten zur Depletion der roten Pulpa beitragen. Eine Beeinflussung der Lymphozytenzahl in der roten Pulpa durch die Depletion der weißen Pulpa in Form einer verminderten Zahl an rezirkulierenden Lymphozyten ist unwahrscheinlich, da mit gewissen tierartlichen Unterschieden die Abwanderung vornehmlich über afferente Lymphgefäße erfolgt (Anderson und Weiss 1976, Brelinska und Pilgrim 1983, Strasser 1986b).

Die Behandlung mit Imexon und Dexamethason beeinflussten die Lymphozytendepletion in der roten Pulpa nicht.

5.6.2.1.1.2 Granulozyten

Die Granulozyten in der roten Pulpa, dargestellt mit dem Antikörper MAC-1, haben im vorliegenden Versuch nach sieben Stunden unter dem Einfluss von GalN/LPS nicht an Zahl zugenommen. Bei den Tieren, die in der Agonie getötet werden mussten, schienen sie gegenüber den Kontrolltieren sogar etwas reduziert zu sein. In der Imexon-Gruppe hingegen war die Zahl der Granulozyten leicht, nach Behandlung mit Dexamethason sehr stark erhöht. Bei Untersuchungen von Deschl (1999) entwickelte sich im Verlauf der GalN/LPS-Hepatitis im Differentialblutbild nach sechs Stunden unter dem Einfluss von Imexon und noch stärker nach Behandlung mit Dexamethason eine zunehmende Neutrophilie. Die Verhältnisse in der Milz entsprechen der Entwicklung der Granulozytenzahl im peripheren Blut. Die vor allem in der Dexamethason-Gruppe auffällige Konzentrierung neutrophiler Granulozyten in den an die Marginalzone angrenzenden Bereichen weist aber auf eine lokal verstärkte Retention der Zellen hin. Die Bedeutung der Milz bei der Regulierung der Granulozytenzahl durch Retention der Zellen im retikulären Netzwerk der roten Pulpa wird allerdings eher in Bezug auf den Abbau dieser Zellen denn in der Funktion als Reservepool vermutet (Haslett et al. 1987, Hogg 1995). In diesem Zusammenhang könnte für die Dexamethason-induzierte Konzentrierung von Granulozyten in der Milz auch eine Glukokortikoid-bedingte Apoptosehemmung (Meagher et al. 1996) eine Rolle spielen.

In Blut und Milz nehmen neben Makrophagen v.a. Granulozyten einen großen Teil des zirkulierenden LPS auf (Freudenberg und Galanos 1990), wobei es zur Veränderung der Aktivität und Phagozytosefähigkeit dieser Zellen sowie zur Ausschüttung von Enzymen und Mediatoren kommt (Morrison und Ulevitch 1979). Untersuchungen von Salkowski et al. (1995) über die LPS-induzierte Zytokinproduktion nach Depletion der Gewebsmakrophagen legen die Vermutung nahe, dass für die Erhöhung des TNF α -Spiegels im Blut sowie auch für die TNF α -Bildung in der Milz neben Makrophagen und interdigitierenden Zellen u.a. aktivierte Granulozyten und Endothelzellen verantwortlich sind. Im vorliegenden Versuch geht der Anstieg der Granulozytenzahl in der Milz mit einer Reduktion der Leberschädigung und der Letalität einher, d.h. parallel zum Anstieg der Granulozytenzahl kommt es eher zum Schutz vor, als zu einer Verstärkung der LPS-induzierten Schädigungen. Untersuchungen von Munford und Hall (1986) über die Detoxifizierung von LPS durch Humangranulozyten beim Menschen könnten zwar ein Hinweis auf eine solche schützende Wirkung von Granulozyten sein, ob aber der Zunahme von Granulozyten in der roten Pulpa überhaupt eine Bedeutung für die Ausprägung der Leberschädigung zu kommt, ist im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht zu klären.

5.6.2.1.1.3 Makrophagen

Die Makrophagen der roten Pulpa wurden mit den monoklonalen Antikörpern F4/80, MOMA-2 und MAC-1 markiert. Nach Stimulation mit GalN/LPS konnte bei der Darstellung mit Hilfe von F4/80 und MOMA-2 in allen Gruppen eine Aktivierung der Makrophagen in Form einer Vergrößerung und Abrundung der Zellen sowie einer Verbreiterung des Zytoplasmas beobachtet werden. Bei Färbung mit dem Antikörper F4/80 stellte sich die Morphologie der Einzelzelle besonders gut dar, so dass hier substanzabhängige Unterschiede erkennbar waren. Während nach Behandlung mit Imexon auch bei den in der Agonie getöteten Tieren fast alle Zellen aktiviert zu sein schienen und eine flächigere zytoplasmatische Expression zeigten, war ihre Zahl in der Dexamethason-Gruppe und mehr noch in der LPS-Gruppe deutlich geringer. Die Stimulation von Makrophagen als eine der immunmodulierenden Wirkungen von Imexon wurde von Bicker und Hebold (1977b) nachgewiesen und bei Untersuchungen anderer 2-Cyanaziridine bestätigt (Bonfert et al. 1977, Hadden und Coffey 1980). Diese Wirkung von Imexon scheint im GalN/LPS-Modell in der roten Pulpa zu einer Verstärkung der LPS-induzierten Makrophagenaktivierung zu führen. Die Bedeutung der Makrophagen der roten Pulpa für die Pathogenese der LPS-induzierten Schädigungen ist nicht völlig geklärt. Einerseits wurde nachgewiesen, dass LPS in der Milz in den ersten Stunden nach der Injektion außer von den Makrophagen der Marginalzonen auch von Makrophagen der roten Pulpa aufgenommen wird (Groeneveld und Van Rooijen 1985, Ge et al. 1994, Goodlad und Macartney 1995), was deren Beteiligung an der frühen Zytokinausschüttung nahelegt,

andererseits konnte durch eine Depletion von Makrophagen der roten Pulpa und der Marginalzone mit Hilfe von Liposomen gezeigt werden, dass diese Zellen an der Pyrogenausschüttung, nicht aber an der Vermittlung der letalen Wirkung und der verstärkten Bildung von TNF α -mRNA beteiligt sind (Groeneveld et al. 1988, Salkowski et al. 1995). Es wird vermutet, dass die Makrophagen der roten Pulpa Filterfunktion haben (Van Rooijen et al. 1989a, 1989b). Die immunogene Wirkung von Haptenen wird durch die Aufnahme von Makrophagen der roten Pulpa abgeschwächt, wohingegen die Retention der Antigene in der Marginalzone die immunogene Wirkung verstärkt (Humphrey 1981).

Im Hinblick auf die Veränderung des Aktivierungszustandes dieser Makrophagensubpopulation sind die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bei Betrachtung der verschiedenen Marker in der LPS-Gruppe nicht einheitlich. Während bei Markierung mit F4/80 und MOMA-2 auch ohne zusätzliche Behandlung die morphologischen Veränderungen der Zellen auf eine teilweise Aktivierung hindeuten schienen, kam es bei Darstellung mit dem Antikörper MAC-1 eher zu einer Abschwächung der Expression. Das MAC-1-Antigen hat eine Bedeutung für die Phagozytoseaktivität der exprimierenden Zelle. Die MAC-1-Expression steigt z.B. bei Stimulation mit chemotaktischen Substanzen an (Beller et al. 1982, Kürzinger und Springer 1982, Springer und Anderson 1986, vgl. Kap. 2.5.2.1). Eine Abschwächung der Expression könnte somit auf einen Aktivitätsverlust hindeuten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Groeneveld et al. (1986) über die Wirkung von LPS auf verschiedene Makrophagenpopulationen der Milz. Die Autoren fanden bei den Makrophagen der roten Pulpa in dieser frühen Phase nach der Verabreichung von LPS eine Abnahme der Aktivität der sauren Phosphatase und damit eine Abnahme der Aktivierung der Zellen, die sich später in eine starke Zunahme der Aktivierung umkehrte (Groeneveld et al. 1986).

Nach vorbeugender Behandlung sowohl mit Imexon als auch mit Dexamethason kam es auch bei Darstellung mit dem Antikörper MAC-1 nicht zu einer Abschwächung der Expression oder sie war deutlich geringer ausgeprägt. Durch die verstärkte Aktivierung bzw. die unverminderte Expression des C3-Rezeptors der Makrophagen in der roten Pulpa könnte es in den beiden Behandlungsgruppen zu einer Umverteilung der LPS-Aufnahme zugunsten dieser Zellen und weg von Makrophagenpopulationen der weißen Pulpa kommen. Eine verstärkte Retention in der roten Pulpa wiederum würde auch die Wirkung von LPS auf andere Zellpopulationen der Milz abschwächen. Alternativ könnte es im Rahmen der zusätzlichen Aktivierung durch Imexon zur Änderung des Zytokinprofils der Makrophagen in der roten Pulpa, z.B. in Form einer Zunahme protektiver Botenstoffe kommen. Unter dem Einfluss von LPS ist in der Milz die Bildung solcher Stoffe, z.B. von IL1-Rezeptor-Antagonist, durch Makrophagen nachgewiesen worden (Chensue et al. 1991, Salkowski et al. 1995).

5.6.2.1.2 Marginalzone

Auch in der Marginalzone kam es im vorliegenden Versuch nach Stimulation mit GalN/LPS in allen Therapiegruppen zu einer ausgeprägten Hyperämie und Lymphozytendepletion. Letztere war aber in diesem Kompartiment bei den Tieren der LPS-Gruppe im Durchschnitt stärker ausgeprägt als nach Vorbehandlung mit Imexon oder Dexamethason, wobei Tiere mit der stärksten Leberschädigung auch den größten Zellverlust in der Marginalzone erkennen ließen. Die Marginalzonendepletion ist ein LPS-spezifisches Phänomen (Groeneveld et al. 1985, 1986, 1988, Liu et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit wurden die betroffenen Zellen mit Hilfe immunologischer Marker weiter differenziert.

5.6.2.1.2.1 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten treten neben den B-Lymphozyten in der Marginalzone zahlenmäßig stark in den Hintergrund (Groeneveld et al. 1988). Im vorliegenden Versuch war jedoch auch bei dieser Population nach Stimulation mit GalN/LPS eine Reduktion der Zellzahl erkennbar. Wie in der roten Pulpa trat in der Marginalzone in allen drei Therapiegruppen eine weitgehend vollständige Depletion ein. Im Hinblick auf den Grad der Depletion war kein quantifizierbarer Unterschied zwischen den verschiedenen T-Zellsubpopulationen zu erkennen.

Die Marginalzone ist der Ort, an dem u.a. T-Lymphozyten das Gefäßsystem verlassen, um in die rote oder weiße Pulpa einzutreten (Brelinska und Pilgrim 1983, Van Ewijk et Nieuwenhuis 1985, Van Rooijen et al. 1989c). Daher könnte die Abnahme der T-Zellzahl in diesem Bereich wie auch in der roten Pulpa eine Folge der GalN/LPS-bedingten hämatologischen oder hämodynamischen Veränderungen sein. Außerdem kommt es durch die LPS-Stimulation zur Abwanderung der B-Zellen (vgl. Kap. 5.6.2.1.2.2) und zur Schädigung der Marginalzonenmakrophagen (vgl. Kap. 5.6.2.1.2.3) und damit zur Veränderung des zellulären Umfeldes der T-Zellen in der Marginalzone, was auch eine Reduktion der Zellzahl bedingen könnte.

5.6.2.1.2.2 B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten zeigten im vorliegenden Versuch bei Darstellung mit den drei Antikörpern B220, IgG und IgM gleichartige Veränderungen. Nach Stimulation mit GalN/LPS war es nach sieben Stunden bereits zur weitestgehenden Depletion der Marginalzone gekommen. Nur am inneren Rand zum Follikel hin waren noch vereinzelt markierte Zellen anzutreffen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Groeneveld et al. (1983, 1985) nach Stimulation mit LPS alleine ab einer Dosierung von 7 µg pro Tier erzielt.

Bei der Depletion der B-Lymphozyten in der Marginalzone handelt es sich um ein LPS-spezifisches Phänomen, das nach Verabreichung anderer B-Zellmitogene nicht auftritt (Groeneveld et al. 1983). Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass es zu einer Wanderung der B-Lymphozyten aus der Marginalzone in die Follikel kommt (Groeneveld et al. 1983, 1985, 1986, vgl. auch Kap. 5.6.2.1.3.1). LPS bewirkt als B-Zellmitogen in vitro (Hu und Möller 1994) und in vivo (Yokochi et al. 1990) eine polyklonale Aktivierung von B-Lymphozyten. Nur ein Teil der B-Lymphozyten der Milz ist aber durch LPS aktivierbar (Hu und Möller 1994). Es wird vermutet, dass die B-Lymphozyten der Marginalzone eine Subpopulation darstellen, die sich in einem besonders LPS-sensitiven Differenzierungsstadium befindet (Groeneveld et al. 1985). Außerdem wurde festgestellt, dass das Phänomen der Marginalzonendepletion in engem Zusammenhang mit den toxischen Eigenschaften von LPS steht. Detoxifiziertes LPS löst kein Abwandern der B-Zellen aus der Marginalzone aus (Groeneveld et al. 1985). Bei der B-Zellwanderung könnten daher sowohl die mitogene als auch die toxische Wirkung von LPS z.B. über eine Schädigung der ansässigen Makrophagensubpopulation (vgl. Kap. 5.6.2.1.2.3) eine Rolle spielen (Groeneveld und Van Rooijen 1985).

Unabhängig von der zusätzlichen Behandlung korrelierte die Lymphozytendepletion im vorliegenden Versuch mit dem Grad der Leberschädigung bis auf wenige Ausnahmen auch bei Vergleich der Einzeltierbefunde. Sie war somit unter dem Einfluss von Imexon trotz großer Streubreite im Durchschnitt weniger stark ausgeprägt als in der LPS-Gruppe. Obwohl Untersuchungen in vivo und in vitro auf eine B-Zell-hemmende Wirkung von Imexon hinweisen (Haag und Hermann 1989, Franken 1990, Steger 1993), scheint die Substanz die Mitogen-stimulierte B-Zellaktivierung nur geringgradig zu hemmen (Franken 1990, Funk et al. 1992, Hersh et al. 1992). Die Wirkung von Imexon auf die B-Lymphozyten der Marginalzone scheint wie auch die Beeinflussung der Leberschädigung nach LPS-Stimulation vielmehr von Schwankungen der immunologischen Reaktionsbereitschaft des Tieres abzuhängen.

In der Dexamethason-Gruppe kommt es bei keinem Tier zur völligen Depletion, d.h. auch unter dem Einfluss von Dexamethason entspricht die Stärke der Marginalzonendepletion dem Grad der Leberschädigung. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Depletion der Marginalzone, wie auch die Leberschädigung, von der Reaktion des Organismus auf LPS abhängt und, da Dexamethason bei B-Zellen einen verstärkten Zelluntergang auslöst, die Reaktion der intakten Zellen auf LPS aber nicht beeinflusst (Sabbele et al. 1987), dass die Abwanderung der B-Zellen nicht alleine eine Reaktion auf die LPS-Stimulation darstellt, sondern in ihrem Ausmaß zumindest durch andere Zellen oder Botenstoffe moduliert wird.

Die Lokalisation der in der Marginalzone verbleibenden Lymphozyten unterscheidet sich in der vorliegenden Untersuchung substanzabhängig. Unter dem Einfluss von Imexon ballten sie sich zu kleinen Zellkonglomeraten zusammen, in der Dexamethason-Gruppe wie in der LPS-

Gruppe (vgl. auch Groeneveld et al. 1985) lagen die verbleibenden Zellen einzeln eng an die Grenze zum Follikel angelagert. Zur Klärung der Frage, inwieweit eine Zusammenballung der B-Lymphozyten nach Behandlung mit Imexon auf der Beeinflussung der Marginalzonenmakrophagen beruht (vgl. Kap. 5.6.2.1.2.3) oder durch eine direkte Wirkung auf die Lymphozyten ausgelöst wird, wären weitere Untersuchungen notwendig.

5.6.2.1.2.3 Makrophagen

In der Marginalzone werden zwei Subpopulationen von Makrophagen unterschieden, die Marginalzonenmakrophagen und die marginalmetallophilen Makrophagen (Groeneveld et al. 1986, Kraal und Janse 1986). Diese lassen sich aufgrund ihrer Lokalisation, ihrer Phagozytoseeigenschaften und mit Hilfe der monoklonalen Antikörper ER-TR9 und MOMA-1 von einander abgrenzen (Van Vliet et al. 1985, Kraal und Janse 1986).

Das ER-TR9-Antigen wird in der Milz ausschließlich von den Marginalzonenmakrophagen exprimiert (Van Vliet et al. 1985). Diese Makrophagensubpopulation ist durch ihre starke Phagozytoseaktivität und durch die selektive Aufnahme von Polysacchariden wie Ficoll und Pneumokokkensacchariden gekennzeichnet (Humphrey und Grennan 1981, Dijkstra et al. 1985) und steht in engem räumlichen Kontakt zu den in der Marginalzone ansässigen B-Lymphozyten (Dijkstra et al. 1985, Van Vliet et al. 1985). Im vorliegenden Versuch nahmen neben den Lymphozyten der Marginalzone auch die Marginalzonenmakrophagen nach Stimulation mit GalN/LPS deutlich an Zahl ab. Die Abnahme der Zahl der Marginalzonenmakrophagen wird auch in der Literatur als eine der Wirkungen von LPS auf die Zellpopulationen der Milz beschrieben, wobei die Hypothese aufgestellt wurde, dass diese Zellen wegen ihrer starken Phagozytoseaktivität (Groeneveld et al. 1986) und der damit verbundenen Konzentrierung von LPS in dieser Makrophagensubpopulation (Groeneveld und Van Rooijen 1985) vermehrt der zytotoxischen Wirkung von LPS zum Opfer fallen (Groeneveld und Van Rooijen 1985, Groeneveld et al. 1986).

Die Reduktion der Zahl der Marginalzonenmakrophagen entsprach im vorliegenden Versuch in etwa dem Grad der Lymphozytendepletion in der Marginalzone, d.h. sie wurde von der LPS-über die Imexon- zur Dexamethason-Gruppe geringer und war bei den in der Agonie getöteten Tieren maximal. Für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Abnahme der Marginalzonenmakrophagen und der Abwanderung der B-Lymphozyten aus der Marginalzone spricht, dass die B-Lymphozyten der Marginalzone in engem Kontakt mit dieser Makrophagenpopulation stehen (Humphrey und Grennan 1981, Dijkstra et al. 1985) und eine Depletion der Marginalzonenmakrophagen mit Hilfe von DMDP-Liposomen auch zum Verlust der Lymphozyten in diesem Kompartiment führt. Dies ist allerdings vermutlich sekundär durch eine Veränderung der Mikroumgebung oder durch von den Makrophagen freigesetzte Stoffe

bedingt (Van Rooijen et al. 1985, Groeneveld et al. 1988). Gegen einen kausalen Zusammenhang spricht die Tatsache, dass bei Untersuchungen der Milz nach LPS-Stimulus die Abwanderung der B-Lymphozyten zeitlich vor der Reduktion der Makrophagenzahl begann (Groeneveld et al. 1986) und dass sich bei der Repopulation der Marginalzone nach der Makrophagendepletion mit Hilfe von DMDP-Liposomen die Lymphozyten auch vor den Marginalzonenmakrophagen wieder ansiedelten (Van Rooijen et al. 1989a). Die Korrelation beider Veränderungen in der vorliegenden Arbeit auch unter Einfluss der Testsubstanzen kann aber als Indiz für einen Kausalzusammenhang gewertet werden.

Unabhängig von der Stärke der Depletion trat durch die Stimulation mit GalN/LPS in allen Therapiegruppen auch eine Aktivierung in Form von Vergrößerung und Verlust dendritischer Fortsätze ein. Trotzdem ist eine Bedeutung der Marginalzonenmakrophagen für die Vermittlung der toxischen Wirkung von LPS fraglich, da sie in Untersuchungen von Groeneveld et al. (1988) durch DMDP-Liposomen eliminiert worden waren, dadurch jedoch keine Beeinflussung der TNF α -Bildung oder der Leberschädigung nach LPS-Stimulus erzielt werden konnte (Groeneveld et al. 1988). Andererseits konnte der Anstieg des ACTH- und des Kortisonplasmaspiegels nach Verabreichung vergleichbarer LPS-Dosen durch Makrophagenelimination verhindert werden (Derijk et al. 1991).

Unter dem Einfluss von Imexon deutet sich im vorliegenden Versuch auch bei dieser Makrophagensubpopulation eine Verstärkung der Aktivierung an (vgl. Kap. 5.6.2.1.1.3). Nach Behandlung mit Dexamethason hingegen schien die Aktivierung eher gehemmt zu sein. Entsprechend müsste Dexamethason entweder eine direkt hemmende Wirkung auf die Reaktion der Marginalzonenmakrophagen nach LPS-Stimulus haben oder an dieser Reaktion sind sekundär durch Dexamethason gehemmte Mechanismen z.B. Zytokine beteiligt, die durch Imexon nicht gehemmt werden.

Einige der Makrophagen in der Marginalzone reagieren auch mit dem Antikörper MOMA-2. Diese Zellen stellen eine Subpopulation der Marginalzonenmakrophagen dar. Marginalmetalophile Makrophagen exprimieren das Antigen nicht (Kraal et al. 1987). Im vorliegenden Versuch trat auch bei den mit dem Antikörper MOMA-2 markierten Zellen in allen Gruppen nach Stimulation mit GalN/LPS eine leichte Vergrößerung auf. Quantifizierbare Unterschiede in Zellzahl und Größe zwischen den einzelnen Therapiegruppen waren nicht vorhanden. Auffällig war aber, dass bei den scheinbehandelten und allen in der Agonie getöteten Tieren eine Verstärkung der Reaktion mit dem Marker eintrat, während bei den anderen Tieren der Imexon-Gruppe und denen der Dexamethason-Gruppe die Expression kaum zunahm. Da über Funktion und Bedeutung des Antigens wenig bekannt ist (vgl. Kap. 2.5.2.5), ist eine weitergehende Interpretation dieser Abweichung im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht möglich. Sie scheint aber, wie auch die anderen Veränderungen in der Marginalzone, eher mit der Stärke der LPS-induzierten Veränderungen zu korrelieren als substanzabhängig zu sein.

Die Makrophagensubpopulation der marginalmetallophilen Makrophagen zeichnet sich durch die Expression des MOMA-1-Antigens aus. Diese Zellen sind in der Marginalzone angrenzend an Follikel und PALS am inneren Rand des Marginalsinus lokalisiert und entsenden viele Fortsätze in die inneren Bereiche der weißen Pulpa (Eikelenboom et al. 1985, Kraal und Janse 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Stimulation mit GalN/LPS eine geringgradige Reduktion der Zellzahl festgestellt. Neben einer deutlichen Ausrichtung der in der Marginalzone verbliebenen Zellen in Richtung Follikel war eine Zunahme positiver Zellen in den Follikeln erkennbar. Vergleichbare Veränderungen wurden auch von Groeneveld et al. (1983) nach der Stimulation mit LPS beobachtet. Es wird vermutet, dass die Zellen aufgrund ihrer geringeren Phagozytoseaktivität (Groeneveld und Van Rooijen 1984, Pai et al. 1996) weniger empfänglich für die toxische Wirkung von LPS sind (Groeneveld und Van Rooijen 1985). Der Abnahme der marginalmetallophilen Makrophagen dürfte somit weniger eine Schädigung durch LPS zugrunde liegen als vielmehr eine Wanderung der Zellen in die Follikel (Groeneveld et al. 1983, 1986). Die marginalmetallophilen Makrophagen sollen einen Reservepool weniger differenzierter Phagozyten darstellen, aus dem heraus sich nach Stimulation z.B. Tingible-body-Makrophagen differenzieren können (Groeneveld et al. 1983). Außerdem wird den marginalmetallophilen Makrophagen eine Bedeutung bei der Steuerung der Lymphozytenwanderung in der Milz und der Immunantwort, an der Lymphozyten beteiligt sind, zu gesprochen (Brelinska und Pilgrim 1983, Groeneveld et al. 1983, Eikelenboom et al. 1985). In jedem Falle scheint ihre Wanderung bis in das Zentrum der Follikel ebenso wie die Depletion der Marginalzonenlymphozyten ein LPS-spezifisches Phänomen zu sein (Groeneveld et al. 1983).

Die Wanderung der MOMA-1-positiven Zellen in die Follikel wurde von den Prüfsubstanzen nicht beeinflusst.

Die Größe der marginalmetallophilen Zellen aber nahm unter dem Einfluss von Imexon, im Gegensatz zu Tieren der scheinbehandelten Gruppe, deutlich zu und die zytoplasmatische Expression schien in dieser Gruppe flächiger zu sein. Diese Unterschiede waren auch bei den in der Agonie getöteten Tieren deutlich und sind demnach als substanzabhängig zu betrachten. Neben den Makrophagen der roten Pulpa scheint auch diese Makrophagensubpopulation für die stimulierende Wirkung von Imexon empfänglich zu sein. Nach Behandlung mit Dexamethason ist eine flächigere Expression in geringerem Maße als in der Imexon-Gruppe auch erkennbar. Inwieweit diese direkt substanzbedingt oder sekundär z.B. über Änderungen im Zytokinprofil ausgelöst ist, ist im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht zu klären. Bemerkenswert ist allerdings, dass sich eine ähnliche Abstufung in der Veränderung der Expression unter Substanzeinfluss auch bei den Makrophagen der roten Pulpa bei Markierung mit dem Antikörper F4/80 andeutet (vgl. Kap. 5.6.2.1.1.3).

5.6.2.1.3 Follikel

5.6.2.1.3.1 Lymphozyten

Die B-Zellfollikel zeigten in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation mit GalN/LPS eine Vergrößerung, die auch morphometrisch nachgewiesen werden konnte. Damit konnte die Untersuchung von Groeneveld et al. (1985) über eine Ausdehnung der B-Zell-abhängigen Bereiche unter dem Einfluss von LPS bestätigt werden. Bei allen Therapiegruppen fiel zudem eine Angleichung der IgM-Expression der Lymphozyten im Follikel an die Expression der Marginalzonenlymphozyten auf, die ohne LPS-Stimulation das Immunglobulin etwas stärker exprimierten als die Lymphozyten im Follikel. Der Unterschied in der Stärke der IgM-Expression war bei allen Tieren der Kontrollgruppen deutlich erkennbar. Diese Veränderung kann als Hinweis für eine Wanderung der B-Lymphozyten aus der Marginalzone in die B-Zellfollikel gewertet werden, da zwar die Mitogen-stimulierte Aktivierung von B-Lymphozyten durch einen Anstieg der IgM-Sekretion gekennzeichnet ist (Roitt 1993, Jones et al. 1994), aber in verschiedenen In-vitro-Studien (Monroe et al. 1983, Groeneveld et al. 1985) gezeigt werden konnte, dass die IgM-Expression auf der Oberfläche von B-Lymphozyten nach Antigenstimulation relativ konstant bleibt. Ebenso wie die Zunahme von Zellen des Typs IgM⁺/IgD⁻ im Follikel nach Stimulation mit LPS in der Untersuchung von Groeneveld et al. (1985) auf eine Zuwanderung von Marginalzonenlymphozyten zurückgeführt wird, kann vermutlich auch die stärkere Reaktion mit dem Antikörper IgM nach Stimulation mit GalN/LPS im vorliegenden Versuch auf eine Zuwanderung stärker exprimierender Zellen aus der Marginalzone zurückgeführt werden.

Dass weder die vorbeugende Behandlung mit Imexon noch die mit Dexamethason einen signifikanten Einfluss auf die Veränderung der Expression und der Ausdehnung der Follikel hatte, kann angesichts der geringen Unterschiede in der Zahl der in der Marginalzone verbleibenden Lymphozyten nicht verwundern. Eine Reduktion der IgM-positiven Lymphozyten, wie sie unter Langzeit-Therapie mit Imexon eintrat (Steger 1993), war nach der einmaligen Verabreichung von Imexon im beobachteten Zeitraum nicht zu erkennen.

5.6.2.1.3.2 Makrophagen, Follikular-dendritische-Zellen

Die Makrophagen im Follikelbereich zeigten im vorliegenden Versuch bei Darstellung mit dem monoklonalen Antikörper MOMA-2 nach Stimulation mit GalN/LPS eine deutlich verstärkte Aktivität in Form von Vergrößerung und Abrundung der Zellen. Bei vielen der Makrophagen war im Zytoplasma das charakteristische Bild phagozytierter Zelltrümmer zu sehen, dem die Zellen den Namen Tingible-body-Makrophagen verdanken (Groeneveld und Van Rooijen

1985). Ein vergleichbares Bild wird auch bei Untersuchung der Follikel nach der Stimulation mit LPS alleine beschrieben. Allerdings tritt hier, wie auch bei Veränderungen der Lymphozytenzahl im Follikel (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.1, Kap 5.6.2.2.3.1), die maximale Ausprägung zu einem späteren Zeitpunkt ein (Groeneveld et al. 1983). Shiratori et al. (1990a) fanden bei Darstellung mit dem Antikörper MAC-3 gleichzeitig eine Zunahme der Makrophagenzahl. Eine solche Zunahme war im vorliegenden Versuch bei Darstellung mit dem Antikörper MOMA-2 nicht zu erkennen. Allerdings ist die Steigerung der Expression durch Differenzierung und Aktivierung eines der Charakteristika des Antikörpers MAC-3 (Ralph et al. 1983), was eine Zunahme der MAC-3-positiven Zellen nach Stimulation mit LPS erklären könnte, während die Stärke der Expression des MOMA-2-Antigens einzelne Makrophagensubpopulationen zu charakterisieren scheint (Kraal et al. 1987, Bilyk und Holt 1991).

Die Zelltrümmer im Zytoplasma der Tingible-body-Makrophagen stellen in erster Linie phagozytierte Lymphozyten dar (Eikelenboom et al. 1985, Van Rooijen et al. 1989b). Sie treten z.B. auch im Rahmen der Lymphoblastenbildung vermehrt auf (Chen et al. 1978). Den Tingible-body-Makrophagen kommt dabei als Gewebsmakrophagen der B-Zell-abhängigen Milzareale u.a. die Aufgabe des Abbaus zugrunde gegangener B-Lymphozyten zu (Chen et al. 1978), d.h. die verstärkte Phagozytoseaktivität steht im vorliegenden Versuch vermutlich mit dem erhöhten Apoptoseaufkommen in den Follikeln in Zusammenhang (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.3). Außerdem ist nach intravenöser Injektion in der Milz nach vierundzwanzig Stunden, d.h. zum gleichen Zeitpunkt, zu dem die Makrophagen auch besonders ausgeprägte Zeichen von Aktivierung zeigen (Groeneveld et al. 1983, 1986), verstärkt LPS in den Tingible-body-Makrophagen der Follikel nachweisbar (Groeneveld und Van Rooijen 1985). Die Tingible-body-Makrophagen sind an der Phagozytose von Fremdpartikel allgemein und von LPS im Besonderen beteiligt (Chen et al. 1978, Groeneveld und Van Rooijen 1985). Bei sensitiven B-Lymphozyten ihrerseits bewirkt LPS-Stimulierung u.a. eine Hochregulierung der MHC-Expression (Hu und Möller 1994). Daher könnte die Aktivierung der Makrophagen im Follikel nicht nur als Reaktion dieser Zellen auf den Kontakt mit LPS sondern auch als Reaktion auf den Kontakt mit den eingewanderten B-Zellen gewertet werden.

Die vorbeugende Behandlung mit Imexon hatte weder einen Einfluss auf die Zahl der apoptotischen Zelluntergänge (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.3) sieben Stunden nach GalN/LPS-Stimulus noch auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen in diesem Milzkompartiment.

Unter dem Einfluss von Dexamethason hingegen schienen die Makrophagen im Follikel bei der Mehrzahl der Tiere weniger stark vergrößert zu sein, obwohl die Apoptosehäufigkeit in der Dexamethason-Gruppe zu diesem Zeitpunkt gegenüber der LPS-Gruppe verstärkt war (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.3). Daher ist zu vermuten, dass Dexamethason die Makrophagenaktivität bzw. die Phagozytoseaktivität der Makrophagen im Follikel zu einem gewissen Grad hemmt. Eine solche Hemmung könnte allerdings auch im Umkehrschluss die Zunahme apoptotischer

Lymphozyten, die sonst innerhalb von weniger als ein bis zwei Stunden (Smith et al. 1996) von umgebenden Zellen aufgenommen und nicht mehr sichtbar sind, mit bedingen (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.3). Dexamethason hemmt bei vielen Makrophagensubpopulationen die LPS-induzierten Zytokinexpression (Beutler et al. 1986, Knudsen et al. 1987, Lee et al. 1988, Waage und Bakke 1988, Remick et al. 1989, Chensue et al. 1991). Es wird aber auch eine Suppression anderer immunologischer Reaktionen dieser Zellen, z.B. der Wanderung in Entzündungsgebiete (Mizobe et al. 1997) oder der Antigenpräsentation und der nachfolgenden T-Zellproliferation (Synder und Unanue 1982, Unanue 1984, Moser et al. 1995), beschrieben, denen u.a. die verminderte Expression bestimmter Oberflächenantigene zugrunde liegt. Das Erkennen und die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen ist ebenso wie andere Zell-Zell-Interaktionen ein Prozess, bei dem die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle notwendig ist, welche mit den Membranstrukturen der veränderten Zellen reagieren können (Cohen und Duke 1992). Die Art der Oberflächenmoleküle kann sich in Abhängigkeit von Gewebe und Makrophagenpopulation unterscheiden (Cohen und Duke 1992). Möglicherweise wird durch Dexamethason bei den Tingible-body-Makrophagen die Expression bestimmter Oberflächenantigene und damit die Phagozytose apoptotischer Lymphozyten beeinträchtigt.

In allen Therapiegruppen reagierten einige Makrophagen v.a. in der Peripherie der Follikel mit dem Antikörper MOMA-1. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um zugewanderte Zellen aus der Marginalzone handelt (Groeneveld et al. 1983, 1986, vgl. auch Kap. 5.6.2.1.2.3). Die Wanderung der Makrophagen in die Follikel und deren Lokalisation wurden durch die Behandlung mit Imexon und Dexamethason nicht sichtbar beeinflusst.

Obwohl auch die Follikular-dendritischen-Zellen an der Bindung von LPS beteiligt sind und nach LPS-Kontakt Veränderungen im Antigenbindungsverhalten beschrieben wurden (Groeneveld et al. 1983, Groeneveld und Van Rooijen 1985), ließen diese Zellen im Gegensatz zu den Makrophagen bei Darstellung mit MOMA-2 in keiner der Therapiegruppen eine Veränderung erkennen.

5.6.2.1.3.3 Apoptosen

Die Apoptosehäufigkeit im Follikel war sieben Stunden nach der Stimulation mit GalN/LPS stark erhöht. Die als apoptotisch angesprochenen Zellen zeigten deutlich die Charakteristika apoptotischer Lymphozyten (Cohen und Duke 1992, Norimatsu et al. 1995). Die Induktion von Apoptose bei Lymphozyten durch LPS vor allem im Thymus, aber auch in Lymphknoten und Milz in vivo ist von Norimatsu et al. (1995) histologisch und mit Gelelektrophorese nachgewiesen worden. Untersuchungen über die Beeinflussung der Immunantwort durch LPS sowie eine immunhistologische Charakterisierung der apoptotischen Zellen nach LPS-Stimulus in der Milz zeigen, dass durch LPS in den Follikeln die Apoptose Ig-positiver Zellen induziert

wird (Yokochi et al. 1996). Die Ergebnisse von Morikawa et al. (1996), nach denen es nach der zusätzlichen Applikation von GalN zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Zellpopulationen kommt, die für die LPS-induzierte Apoptose empfänglich sind, konnten im vorliegenden Versuch nicht bestätigt werden. Die Beurteilung der Apoptosehäufigkeit erfolgte allerdings in der Milz ausschließlich anhand morphologischer Kriterien bei H.E.-Färbung. Möglicherweise sind jedoch einzelne apoptotische Lymphozyten außerhalb von Follikel und PALS, bzw. Apoptosen bei anderen Zellpopulationen wie Makrophagen und Granulozyten, bei lichtmikroskopischer Beurteilung gegenüber einer Markierung mit DNA-Nick-End-Labeling weniger gut identifizierbar.

Durch LPS selbst konnte in vitro bei B-Zellen keine Apoptose induziert werden (Yokochi et al. 1996), d.h. auch in Bezug auf die Apoptose von B-Lymphozyten spielen sekundäre Faktoren eine entscheidende Rolle. Aufgrund ihres Einflusses auf die Apoptoseregulierung bei verschiedenen Zellpopulationen (Zacharchuk et al. 1990, Leist et al. 1995a) sowie der Korrelation ihrer Plasmaspiegel nach LPS-Stimulation mit der Apoptosehäufigkeit (Norimatsu et al. 1995) wird TNF α und/ oder endogenen Glukokortikoiden eine Bedeutung bei der Induktion von Apoptose bei Lymphozyten durch LPS zugeschrieben. Gegenüber einer TNF α -induzierten Apoptose scheinen B-Lymphozyten weniger sensitiv zu sein (Scott et al. 1996). Im Gegenteil kann TNF α sogar vor B-Zellrezeptor-vermittelter Apoptose schützen (Lens et al. 1996). Gleichzeitig ist allerdings unter dem Einfluss von TNF α eine Verstärkung der Expression des FAS-Antigens auf B-Zellen sowie eine Sensitivierung gegenüber FAS-vermittelter Apoptose (Lens et al. 1996) festgestellt worden. Größere Bedeutung bei der Induktion von Apoptose bei B-Lymphozyten scheint aber im vorliegenden Modell den Glukokortikoiden zuzukommen. Durch Injektion von Hydrokortison konnten bei Gedächtniszellen im histologischen Bild und in der Immunantwort Veränderungen erzielt werden, die mit den LPS-induzierten vergleichbar sind (Yokochi et al. 1996). Außerdem wurde unter dem Einfluss von LPS eine Reduktion der Bcl-2-Expression bei Ig-positiven Zellen festgestellt (Yokochi et al. 1996). Bcl-2 nimmt eine Schlüsselrolle bei der Apoptosehemmung z.B. bei Lymphblasten ein und scheint auch bei Glukokortikoid-abhängigen Apoptosemechanismen von Bedeutung zu sein (Korsmeyer 1992, McConkey et al. 1996, Mor und Cohen 1996). Bei unreifen und entarteten B-Zellen konnten mit Dexamethason direkt Apoptosen induziert werden (Garvy et al. 1993, McConkey et al. 1996), bei reifen B-Lymphozyten hingegen war dies in nur sehr geringem Maße möglich (Scott et al. 1996), allerdings konnten hier deutliche Synergieeffekte bei gleichzeitiger Antigenstimulierung erzielt werden. Aktivierung von reifen B-Zellen bzw. von B-Gedächtniszellen macht die Zellen empfänglich für Apoptosesignale (Parry et al. 1994, Lens et al. 1996, Scott et al. 1996). Mitogene können hierbei verstärkend wirken (Lagresle et al. 1995, Onel et al. 1995) oder bei Gedächtniszellen sogar Apoptose induzieren, wobei auch hier eine Beteiligung von endogenen Glukokortikoiden und einer Hemmung der Bcl-2-Expression vermutet wird (Yokochi et al. 1996). Als Hinweis auf die

mögliche Bedeutung von Glukokortikoiden für die LPS-induzierte Apoptose der B-Lymphozyten in den B-Zellfollikeln der Milz können auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gewertet werden: die Zahl apoptotischer Zellen nahm durch die Behandlung mit Dexamethason stark zu, die Hemmung des Anstiegs des TNF α -Plasmaspiegels in der Dexamethason-Gruppe hingegen hatte keinerlei schützende Wirkung. Die Beteiligung der Makrophagenhemmung (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.2) am Anstieg der Zahl von Apoptosen ist hierbei allerdings gegenüber einer Dexamethason-bedingten Zunahme der Apoptoseinzidenz nicht abzugrenzen.

Die vorbeugende Behandlung mit Imexon beeinflusste die Apoptoseinzidenz im Follikel zu diesem Zeitpunkt nicht.

5.6.2.1.4 PALS

In der PALS war die Zelldichte im vorliegenden Versuch nach Stimulation mit GalN/LPS deutlich verringert. Durch vorbeugende Behandlung mit Imexon konnte die Depletion nur wenig und mit sehr uneinheitlichem Bild gehemmt werden. Unter dem Einfluss von Dexamethason nahm die Gesamtzahl der Zellen nicht so stark ab, allerdings wird der Vergleich mit den beiden anderen Gruppen durch die hohe Zahl von apoptotisch veränderten Zellen erschwert (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.4).

Den Hauptteil der in der PALS anzutreffenden Zellen stellen die T-Lymphozyten (Van Rooijen et al. 1989b). B-Lymphozyten sind weniger zahlreich und v.a. in den äußeren Bereichen der PALS lokalisiert (Eikelenboom et al. 1985, Van Rooijen et al. 1989b). Da sich die Lymphozytensubpopulationen, aus denen sich das Gesamtbild der klassischen Histologie zusammensetzt, in den verschiedenen Therapiegruppen unterschiedlich entwickeln, ist eine Interpretation dieses Befundes nur unter gesonderter Betrachtung der einzelnen Populationen im Rahmen der immunhistologischen Darstellung möglich.

5.6.2.1.4.1 T-Lymphozyten

Die T-Gesamt-Zellen (Thy-1.2) ließen eine deutliche Reduktion der Zellzahl erkennen. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Milz-FACS-Analyse, in der eine signifikante Abnahme des Anteils der T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten ermittelt wurde (vgl. Kap. 5.6.1).

Die Depletion der T-Zellen in der inneren PALS ist auch bei Untersuchungen der Milz nach Stimulation mit LPS alleine beschrieben worden (Groeneveld und Van Rooijen 1984, Groeneveld et al. 1986, 1988); sie war dort nach sechs Stunden bereits weit fortgeschritten (Groeneveld et al. 1986). Allerdings wurden keine Hinweise auf einen vermehrten Zelluntergang in diesem Bereich gefunden (Groeneveld und Van Rooijen 1984). Auch im vorliegenden Versuch war zum vorgegebenen Zeitpunkt die Apoptoseinzidenz nur

geringgradig erhöht (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.4). Zwar kann eine toxische Schädigung von T-Zellen durch LPS zu einem früheren Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, verschiedene Beobachtungen deuten jedoch auf eine Abwanderung der T-Lymphozyten hin (Groeneveld et al. 1986). Für die selektive Retention von T-Zellen in der PALS sind Wechselbeziehungen mit ansässigen dendritischen Zellen, den interdigitierenden Zellen, von besonderer Bedeutung (Brelinska und Pilgrim 1983, Van Ewijk und Nieuwenhuis 1985, Groeneveld et al. 1986). Gerade in diesen Zellen tritt aber schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Konzentrierung des injizierten LPS auf (Groeneveld und Van Rooijen 1985) und es konnten unter LPS-Einfluss eine Veränderung der Expression von Oberflächenantigenen bei diesen dendritischen Zellen, eine Verstärkung des Aktivierungspotentials gegenüber T-Zellen sowie eine Wanderung der Zellen von der Marginalzone in die T-Zellareale nachgewiesen werden (Groeneveld et al. 1986, De Smedt et al. 1996). Bei höheren LPS-Dosen war dann nach achtundvierzig Stunden, also zu dem Zeitpunkt, an dem die T-Zelldepletion besonders stark ausgeprägt war (Groeneveld und Van Rooijen 1984, Groeneveld et al. 1986), auch die Zahl der interdigitierenden Zellen in der PALS deutlich reduziert (Groeneveld et al. 1986, De Smedt et al. 1996). Die Veränderung des Umfeldes bzw. die Ausschüttung von Mediatoren und die später eintretende Schädigung der dendritischen Zellen könnten entsprechend eine Abwanderung der T-Lymphozyten aus der PALS oder eine verminderte Retention bewirken.

Die Bedeutung dieser zellulären Veränderungen in der PALS für das LPS-bedingte Krankheitsbild bzw. für die Ausschüttung des Hauptmediators $\text{TNF}\alpha$ ist nicht klar. Ein der GalN/LPS-Hepatitis vergleichbares Krankheitsbild kann durch polyklonale T-Zellaktivierung in Kombination mit GalN erzielt werden, wobei auch in diesem Modell $\text{TNF}\alpha$ als Hauptmediator angesehen wird (Gantner et al. 1995). Ob dabei allerdings T-Zellen die Quelle für $\text{TNF}\alpha$ darstellen oder andere Zellen sekundär durch die T-Zellaktivierung zur $\text{TNF}\alpha$ -Bildung und -Ausschüttung angeregt werden, ist unklar (Gantner et al. 1995). In vitro konnten bei T-Lymphozyten durch verschiedene Stimuli die $\text{TNF}\alpha$ -Bildung bzw. -Ausschüttung induziert werden (Beutler und Cerami 1988, Gantner et al. 1995, Salkowski et al. 1995). Bei Untersuchungen der Zytokin-Gen-Expression in der Milz wurde sowohl bei der T-Zell-abhängigen als auch bei der LPS-induzierten Hepatitis die Bildung von $\text{TNF}\alpha$ m-RNA in der PALS nachgewiesen, wobei vermutet wurde, dass im LPS-Hepatitis-Modell interdigitierende Zellen die $\text{TNF}\alpha$ -Quelle darstellen (Bette et al. 1993). Die Bildung und Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ und anderen Zytokinen konnte in vitro bei Zelllinien dendritischer Milzzellen durch LPS induziert werden (Granucci et al. 1994), was für eine Bedeutung dieser Zellen für LPS-bedingte Veränderungen spricht.

Bei der Betrachtung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen trat zutage, dass die Depletion v.a. die T-Helferzellen betraf. In Zusammenhang mit der Wirkung von LPS auf T-Helferzellen wurde einerseits ein Adjuvanseffekt beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass LPS die

antigenspezifische T-Helfer-Funktion von Milzzellen verstärkt (Armerding und Katz 1974, Mita et al. 1982). Untersuchungen der T-Zell-abhängigen Immunantwort in vitro wenige Stunden nach Verabreichung von Hepatotoxinen, deren Wirkung vermutlich ebenfalls LPS-vermittelt ist, weisen darauf hin, dass die Verstärkung der T-Helfer-Funktion primär durch eine Stimulation von B-Zellen und Makrophagen charakterisiert ist (Babb et al. 1983). Andererseits wurde in verschiedenen Untersuchungen von einer Hemmung T-Zell-abhängiger Immunreaktionen berichtet (Persson 1977, Portnoi et al. 1981, Winchurch et al. 1982), die mit der Abnahme der T-Zellzahl in der PALS in Verbindung gebracht wird (Groeneveld et al. 1986). Die Abnahme des Anteiles der T-Helferzellen an den T-Gesamt-Zellen der Milz konnte im vorliegenden Versuch histologisch bestätigt werden. Über eine Verstärkung der T-Helfer-Funktion ist im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage möglich.

Die Dichte der zytotoxischen und T-Suppressorzellen (Lyt-2) nahm im Gegensatz zu der der T-Helferzellen nach Stimulation mit GalN/LPS zu. In oben genannten Untersuchungen über die Wirkung von Hepatotoxinen auf Zellen des Abwehrsystems (Babb et al. 1983) konnte eine Aktivierung von T-Suppressorzellen beobachtet werden. Kakugawa et al. (2000) gelang der Nachweis, dass LPS-stimulierte Milzzellen eine zytotoxische Immunantwort effektiver induzieren als nicht stimulierte Zellen, wobei die LPS-Wirkung hierbei v.a. über B-Zellen vermittelt ist. In vitro konnte durch LPS bei zytotoxischen Zelllinien und bei ca. 3 % der Milz-T-Zellpopulation eine Proliferation ausgelöst werden (Vogel et al. 1983). In der vorliegenden Arbeit konnte der positive Einfluss von LPS auf die Zahl der CD8-positiven Zellen in der Milz bestätigt werden. Eine Interpretation der Bedeutung dieser Reaktion für andere Zellpopulationen der Milz, wie z.B. Makrophagen oder dendritische Zellen, und das LPS-induzierte Krankheitsgeschehen würde allerdings weitergehende Untersuchungen nötig machen.

Die weitere Spezifizierung der zytotoxischen und T-Suppressorzellen mit Hilfe des Antikörpers Ly-3.2 erbrachte keine zusätzlichen Informationen über die LPS-reaktive Zellpopulation. Der Antikörper markiert eine Untereinheit des CD8-Rezeptors, die auf Mitogen- oder Lymphokin-aktivierten bzw. außerhalb des Thymus gereiften Zellen nicht exprimiert wird (vgl. Kap. 2.5.1.4). Die Dichte der Ly-3.2-positiven Zellen erreichte bei manchen Tieren die der Lyt-2-positiven Zellen. Aufgrund der extrem starken Streuung in allen Gruppen war aber keine Tendenz in der Abweichung der Zahl der Ly-3.2-positiven von der der Lyt-2-positiven Zellen zu erkennen, die zu einer weiteren Charakterisierung der aktivierten zytotoxischen und T-Suppressorzellen beigetragen hätte.

Durch vorbeugende Behandlung mit Imexon konnte die Abnahme der T-Zellen in der PALS deutlich gehemmt werden. Bei Betrachtung der T-Zellsubpopulationen zeigte sich, dass sich die hemmende Wirkung von Imexon auf die Abwanderung der T-Helferzellen beschränkte, während die Zunahme der zytotoxischen und T-Suppressorzellen unbeeinflusst blieb. Schon bei frühen Untersuchungen der immunmodulatorischen Eigenschaften von Imexon wurde eine

Beeinflussung zellvermittelter Abwehrreaktionen, z.B. die DTH-Reaktion, festgestellt (Bicker und Hebold 1977b), wobei neben einer Stimulation der T-Zellantwort je nach Patient und Abwehrlage auch eine Hemmung beobachtet werden konnte (Micksche et al. 1978a, 1978c). In-vitro-Untersuchungen an Mitogen-stimulierten, murinen T-Zellen nach in vivo Imexon-Behandlung ergaben eine Aktivierung bzw. Hemmung der T-Zellantwort in Abhängigkeit von der Imexon-Dosis nach mehreren Tagen (Cerni 1977), und bei Imexon-Exposition PHA-stimulierter T-Lymphozyten wurde in den ersten vierundzwanzig bis achtundvierzig Stunden eine Hemmung der Proteinsynthese und des Zellzyklus festgestellt (Hersh et al. 1992). Inwieweit eine solch hemmende Wirkung bei der Beeinflussung der T-Zellverschiebungen im vorliegenden Versuch eine Rolle spielt, ist im Rahmen dieser Untersuchung nicht zu klären (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.4). Möglicherweise liegt der Angriffspunkt von Imexon aber auch im Bereich der Makrophagen und/ oder dendritischen Zellen in Form von Veränderungen des Zytokinprofils oder der Expression von Oberflächenantigenen (vgl. Kap. 5.6.2.1.1.3, Kap. 5.6.2.1.2.3), die sekundär das Verhalten der T-Zellen beeinflussen. Bei Untersuchungen von Bicker (1975b) konnten mehrere Tage nach Verabreichung anderer 2-Cyanaziridin-Derivate eine Aktivierung von T-Suppressorzellen und eine Verschiebung des Verhältnisses der T-Zellsubpopulationen zueinander zugunsten der zytotoxischen und T-Suppressorzellen festgestellt werden. Dieser Effekt trat allerdings auch erst nach mehrmaliger Behandlung mit Azimexon auf. Auf zellulärer Ebene ist ein solcher Einfluss von Imexon in der vorliegenden Untersuchung nicht zu erkennen. Allenfalls wäre die Frage nach einem Zusammenhang des zusätzlichen Anstiegs des TNF α -Serumspiegels nach Imexon-Behandlung mit einer Beeinflussung der Zellen in diesem Milzkompartiment zu stellen (vgl. Kap. 5.4).

Unter dem Einfluss von Dexamethason war die Zahl der markierten T-Lymphozyten kaum weniger reduziert als in der scheinbehandelten Gruppe. Die Auflockerungserscheinungen zeigten allerdings eine breitere Verteilung als in den beiden anderen Therapiegruppen. Dies und die extreme Zahl apoptotischer Zellen legen den Schluss nahe, dass die Depletion in dieser Gruppe v.a. durch substanzbedingte Zelluntergänge und weniger durch Abwanderung verursacht ist (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.4). Die gesonderte Betrachtung der T-Zellsubpopulationen stützt diese Interpretation. Die Zahl der T-Helferzellen ist trotz vermehrter Apoptosen in dieser Gruppe nicht ganz so stark reduziert wie in der LPS-Gruppe, was auf eine substanzbedingte Hemmung der Zellabwanderung hindeutet. Diese Hemmung würde im Einklang mit der Reduktion anderer LPS-induzierter Veränderungen in der Milz stehen und könnte, wie diese, auf einer Veränderung des Zytokinprofils oder der Expression von Oberflächenmolekülen von Makrophagen (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.2) und/ oder dendritischen Zellen (Moser et al. 1995) unter Einfluss von Dexamethason beruhen. Die Zunahme der Lyt-2-positiven Zellen war in der Dexamethason-Gruppe nur bei manchen Tieren zu erkennen. Inwieweit dies auf eine substanzbedingte Hemmung oder auf eine erhöhte Apoptoseinzidenz beruht, kann im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht beurteilt werden (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.4).

5.6.2.1.4.2 B-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit war die Dichte der B-Zellen (B220, IgG, IgM) in der PALS nach Stimulation mit GalN/LPS geringgradig reduziert. Groeneveld et al. (1985, 1988) fanden in Versuchen mit LPS alleine nach vierundzwanzig Stunden eine Ausdehnung der B-Zellfollikel auch in Richtung auf die PALS und damit eine Zunahme der Zahl der B-Zellen in diesem Bereich. Auch im vorliegenden Versuch dehnten sich die Follikel aus und die Dichte der B-Zellen am Übergang von Follikel zu PALS schien weniger allmählich abzunehmen, aber eine Zunahme von B-Zellen und damit verbunden eine Verkleinerung der T-Zell-dominierten inneren Bereiche der PALS war nicht erkennbar. Die Zunahme der B-Lymphozyten bis in die innere PALS hinein wird in Untersuchungen nach Stimulation mit LPS alleine erst nach vierundzwanzig bzw. in maximaler Ausprägung nach achtundvierzig Stunden beschrieben (Groeneveld und Van Rooijen 1984, Groeneveld et al. 1985). Im vorliegenden Modell kommt es zur frühzeitigeren und schnellen Rückbildung der Verschiebungen innerhalb der B-Zell-abhängigen Areale (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.2, Kap. 5.6.2.2.3.1). Dies könnte erklären, weshalb zu einem Zeitpunkt, an dem die Abwanderung von B-Lymphozyten aus der Marginalzone in die Follikel deutlich ausgeprägt war (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.1), eine Zunahme der B-Zellen in der PALS im vorliegenden Experiment nicht erkennbar war.

Die Reduktion der B-Zellen in der PALS war unter Einfluss von Imexon etwas, nach Behandlung mit Dexamethason stärker gehemmt. Die Beeinflussung durch beide Substanzen entsprach in der Tendenz dem Einfluss auf die Veränderungen der B-Lymphozyten in der Marginalzone und korrelierte mit der Stärke der Reaktion auf die Stimulation mit GalN/LPS (vgl. Kap. 5.6.2.1.2.2).

5.6.2.1.4.3 Makrophagen

Die Mehrzahl der Makrophagen in der PALS zeigten bei Darstellung mit dem Antikörper MOMA-2 in der LPS-Gruppe kaum eine Vergrößerung oder Anzeichen von Phagozytose. LPS ist wenige Stunden nach der Injektion in der PALS weniger in Makrophagen als in dendritischen Zellen lokalisiert (Groeneveld und Van Rooijen 1985) und auch für die Beeinflussung der T-Lymphozyten bzw. die Vermittlung LPS-induzierter Veränderungen scheinen interdigitierende Zellen und weniger Makrophagen von zentraler Bedeutung zu sein (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.1). In der vorliegenden Arbeit war bei den Makrophagen der PALS zu diesem Zeitpunkt in der LPS-Gruppe nur eine geringgradige Aktivierung erkennbar. Unter dem Einfluss von Imexon aber und noch verstärkt nach Verabreichung von Dexamethason waren die Makrophagen der PALS deutlich vergrößert und abgerundet. Die Aktivierung der Makrophagen schien somit zu diesem Zeitpunkt eher mit der Apoptosehäufigkeit als mit der Stärke

der LPS-bedingten Veränderungen zu korrelieren und ist vermutlich v.a. auf die Aufnahme zugrunde gegangener Lymphozyten zurückzuführen (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.4).

5.6.2.1.4.4 Apoptosen

Die Zahl der apoptotischen Zellen in der PALS war nach Stimulation mit LPS in der vorliegenden Untersuchung nur geringgradig erhöht. Norimatsu et al. (1995) fanden durch LPS induzierte Apoptosen in lymphatischen Organen v.a. im Thymus, während in Lymphknoten und Milz die Apoptoseinzidenz nach LPS weniger stark erhöht war. Bei Thymozyten konnten eine Depletion und Apoptosen nach LPS-Injektion nachgewiesen werden (Norimatsu et al. 1995). Nach Immunisierung mit roten Blutzellen vom Schaf waren für diese LPS-induzierte Apoptose in der Milz hingegen v.a. B-Zellen empfänglich (Yokochi et al. 1996). Diese Tendenz konnte in der vorliegenden Arbeit auch ohne eine vorhergehende Immunisierung der Tiere beobachtet werden. Für die Verstärkung der Apoptoseneigung nach LPS-Stimulation wird auch bei T-Zellen v.a. $\text{TNF}\alpha$ und/ oder Glukokortikoiden eine potentielle Bedeutung als Mediatoren zugeschrieben (Norimatsu et al. 1995). Beide Stoffe können bei Thymozyten bzw. T-Zellen Apoptose auslösen (Compton und Cidlowski 1987, Walker et al. 1995, Scott et al. 1996). $\text{TNF}\alpha$ scheint v.a. bei CD8-positiven T-Zellen Apoptose zu induzieren (Zheng et al. 1995). Die Subpopulation der von Apoptose vermehrt betroffenen Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht differenziert. Da aber Aktivierung die Zellen für Apoptose allgemein (Cerwenka et al. 1996) und besonders für $\text{TNF}\alpha$ -abhängige Apoptose (Zheng et al. 1995) sensibilisiert, wäre eine verstärkte Apoptoseneigung v.a. in dieser Subpopulation zu erwarten (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.1). Allerdings spricht die Kinetik der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose achtundvierzig Stunden nach Beginn der Stimulation (Zheng et al. 1995) gegen eine Beteiligung dieses Mediators bei der Induktion der Apoptose von T-Zellen im vorliegenden Versuch. Glukokortikoide lösen v.a. bei Thymozyten und Zelllinien aus T-Zell-hybriden Apoptose aus (Alnemri und Litwack 1989, Zacharchuk et al. 1990, Cidlowski et al. 1995). Aber auch bei antigenspezifischen T-Zellen kann die Apoptoseneigung nach Entzug von Wachstumsfaktoren durch Glukokortikoide verstärkt werden (Cohen und Duke 1992, Walker et al. 1995). Bei Untersuchungen der T-Zellaktivierung bzw. -depletion nach Injektion von Enterotoxin B von *Staphylococcus aureus* (Gonzalo et al. 1993) konnte die Beteiligung von Glukokortikoiden an der kurzzeitigen Reduktion sowohl von T-Helferzellen als auch von zytotoxischen und T-Suppressorzellen in der Milz belegt werden. Auch die deutliche Zunahme von Apoptosen in der PALS nach zusätzlicher Behandlung mit Dexamethason in der vorliegenden Arbeit deuten eher auf eine Bedeutung von Glukokortikoiden für die Apoptoseneigung von T-Zellen in der Milz nach LPS-Stimulation hin.

Auch unter dem Einfluss von Imexon kam es zu einer Verstärkung der LPS-induzierten Apoptoseneigung. Bei Myelomzellen, verschiedenen B-Zelllinien und Mitogen-stimulierten

T-Lymphozyten konnten durch Imexon eine Hemmung des Zellzyklus, eine Akkumulation von Zellen in der S-Phase sowie eine Hemmung der Proteinsynthese mit nachfolgender Hemmung der DNA- und RNA-Bildung ausgelöst werden (Hersh et al. 1992). In einer Untersuchung der Antitumor-Wirkung bei Myelomzellen (Dvorakova et al. 2000) wurden diese Imexon-induzierten Veränderungen als Apoptosen charakterisiert, die durch substanzbedingten oxidativen Stress hervorgerufen werden. Möglicherweise spielt bei der Verstärkung der Apoptoseneigung von T-Zellen im vorliegenden Versuch diese Imexon-Wirkung eine Rolle. Dass dem erhöhten TNF α -Blutspiegel bei der verstärkten Apoptoseneigung der T-Zellen in dieser Gruppe eine Bedeutung zukommt, ist aufgrund oben genannter Erwägungen unwahrscheinlich.

5.6.2.2 Pathologisch-histologische Veränderungen im GalN/LPS-Modell nach vierundzwanzig Stunden

5.6.2.2.1 Rote Pulpa

In der roten Pulpa war das histopathologische Bild vierundzwanzig Stunden nach der Verabreichung von GalN/LPS bei den scheinbehandelten Tieren nur wenig zellreicher als nach sieben Stunden. Unter dem Einfluss von Imexon war zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Repopulation eingetreten. In der Dexamethason-Gruppe war diese weitgehend abgeschlossen. Für den Rückgang der Veränderungen deutet sich somit in diesem Milzkompartiment nach vierundzwanzig Stunden eine negative Korrelation zur Schwere der Leberschädigung an (vgl. Kap. 5.6.2.2.2).

5.6.2.2.1.1 Lymphozyten

Die Repopulation der Lymphozyten in der roten Pulpa entwickelte sich in den verschiedenen Therapiegruppen bei klassisch histopathologischer Beurteilung parallel zur Repopulation in der Marginalzone (vgl. Kap. 5.1.1.1.2.2), wobei aufgrund der geringeren Zelldichte die Abstufung weniger deutlich ist. Allerdings waren bei der immunhistologischen Differenzierung Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen zu erkennen.

Die Zahl der T-Lymphozyten hat in der roten Pulpa bei Markierung mit dem T-Gesamt-Zellmarker, Thy-1.2, vierundzwanzig Stunden nach LPS-Stimulation geringgradig bis deutlich zugenommen. Groeneveld et al. (1988) beschreiben zum gleichen Zeitpunkt eine weitestgehende Depletion der T-Zellen der roten Pulpa. Wie in Follikel und PALS (vgl. Kap. 5.6.2.2.3 und Kap. 5.6.2.2.4) scheint es auch in diesem Kompartiment durch die geringere LPS-Dosis und/ oder die Kombination mit GalN zu einer geringeren Ausprägung

bzw. früheren Rückbildung der LPS-induzierten Veränderungen zu kommen. Bei der Unterscheidung von T-Helferzellen (L3T4) und zytotoxische bzw. T-Suppressorzellen (Lyt-2) wurde deutlich, dass zu diesem Zeitpunkt v.a. die Lyt-2-positiven Zellen noch reduziert waren, während die Zahl der T-Helferzellen sich nicht von der der Kontrolltiere unterschied. In der PALS hatte sich die Zunahme der Lyt-2-positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt größtenteils zurückgebildet (vgl. Kap. 5.6.2.2.4.1). Die Bedeutung des Unterschiedes im Grad der Repopulation der T-Zellsubpopulationen ist im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht zu klären. Untersuchungen von Shiratori et al. (1990a) sprechen gegen eine Beteiligung von T-Zellen am GalN/LPS-induzierten Geschehen zu diesem Zeitpunkt.

Die vorbeugende Behandlung mit Imexon beeinflusste die Zahl der T-Zellen in der roten Pulpa nicht erkennbar.

In der Dexamethason-Gruppe war die Zahl der Zellen bei allen drei T-Zellsubpopulationen in etwa mit der der Kontrolltiere vergleichbar.

Die Zahl der B-Lymphozyten entsprach in der Abstufung der Gruppen ohne Abweichungen der Repopulation der Marginalzone, d.h. sie war bei den scheinbehandelten Tieren etwas, in der Imexon- und der Dexamethason-Gruppe wieder deutlich angewachsen.

Die Dichte der Lymphozyten in der roten Pulpa scheint sich u.a. entsprechend der Stärke der Hyperämie zu reduzieren (vgl. Kap. 5.6.2.1.1.1). Diese ist in der Dexamethason-Gruppe auch makroskopisch am geringsten ausgeprägt (vgl. Kap. 4.12). Eventuell beeinflusst auch die Zahl der Lymphozyten im peripheren Blut die Lymphozytendichte in der roten Pulpa. Bei der Blut-FACS-Analyse deutet sich in der Dexamethason-Gruppe eine stärkere Zunahme der Lymphozytenzahl an als in den beiden anderen Gruppen. Ferner ist zweiundsiebzig Stunden nach GalN/LPS-Stimulation eine Lymphopenie nur noch in der LPS-Gruppe, nicht mehr jedoch nach Vorbehandlung mit Imexon oder Dexamethason nachweisbar (Deschl 1999). Die Veränderung der Lymphozytendichte in der roten Pulpa und der Beginn ihrer Rückbildung scheinen demnach mit hämatologischen und hämodynamischen Veränderungen in Zusammenhang zu stehen und damit letztlich auch von der Stärke der Reaktion des jeweiligen Organismus auf den LPS-Stimulus abzuhängen.

5.6.2.2.1.2 Granulozyten

Die Zahl der Granulozyten (MAC-1) war nach der Stimulation mit GalN/LPS bei allen Tieren unabhängig von einer zusätzlichen Behandlung stark erhöht. Eine Anhäufung von Granulozyten in der roten Pulpa wurde auch bei Untersuchungen von Groeneveld et al. (1988) nach vierundzwanzig Stunden beobachtet. Allerdings scheint es bei dieser LPS-induzierten Veränderung im Gegensatz zu der der Lymphozyten (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.1) nicht zu einer zeit-

lichen Verschiebung durch die Dosis oder die zusätzliche Verabreichung von GalN zu kommen. Die extreme Zunahme der Granulozyten bestätigt sich auch in der FACS-Analyse der Milz, wo sie in der Reduktion des prozentualen Anteils der Lymphozyten an den weißen Blutzellen Ausdruck findet (vgl. Kap. 5.6.1). Wie schon nach sieben Stunden scheinen sich auch nach vierundzwanzig Stunden die Zahlen der Granulozyten in der roten Pulpa und im peripheren Blut gleichläufig zu entwickeln. Untersuchungen des Differentialblutbildes im GalN/LPS-Modell ergaben bereits nach zehn Stunden eine Rückbildung der Neutropenie in der LPS-Gruppe bzw. sogar die Umkehrung in eine Neutrophilie unter dem Einfluss von Imexon und Dexamethason (Deschl 1999). Auch in der Literatur wird nach der Stimulation mit LPS die Umkehr der anfänglichen Neutropenie in eine Neutrophilie beschrieben (Morrison und Ulevitch 1979, Wilson 1985). Zusätzlich könnten zu der extreme Anhäufung von Granulozyten auch Veränderungen in der Expression von Adhäsionsmolekülen beitragen. In der Leber ist die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen, z.B. von MAC-1, für die Akkumulation von Granulozyten im GalN/LPS-Modell nachgewiesen worden (Essani et al. 1995, vgl. Kap. 5.3.1.2). In der Milz zeigten die Makrophagen der roten Pulpa nach vierundzwanzig Stunden eine verstärkte Aktivierung und Hochregulierung der MAC-1-Expression (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.3). Entsprechend könnte die Granulozytenkonzentrierung als Reaktion auf eine LPS-bedingte Hochregulierung des MAC-1-Antigens in diesem Kompartiment gewertet werden. Die in anderen Untersuchungen nachgewiesene Hochregulierung des MAC-1-Antigens bei Granulozyten war aufgrund der starken Anfärbung aller Zellen (vgl. Kap. 5.3.1.2) auch in der Milz im vorliegenden Versuch bei lichtmikroskopischer Beurteilung nicht zu erkennen. In jedem Falle erfolgt die Konzentrierung von Granulozyten wie auch die Zunahme der Aktivierung der Makrophagen in der roten Pulpa unabhängig von der Ausprägung der LPS-induzierten Schädigung in allen Gruppen gleich, so dass kein Kausalzusammenhang mit der Entstehung nekrotischer Veränderungen in der Leber zu vermuten ist (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.3).

Die etwas flächigere, weniger an der Marginalzone ausgerichtete Verteilung der Granulozyten nach Behandlung mit Imexon könnte ebenso wie die stärkere Reaktion der Makrophagen als Beeinflussung der immunologischen Abläufe in diesem Kompartiment durch die Substanz gewertet werden (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.3).

Dexamethason beeinflusste Zahl und Verteilung der Granulozyten in der roten Pulpa zu diesem Zeitpunkt nicht.

5.6.2.2.1.3 Makrophagen

Die Makrophagen der roten Pulpa waren im vorliegenden Versuch nach vierundzwanzig Stunden in allen Therapiegruppen stark vergrößert. LPS wird aus dem Blut in der roten Pulpa v.a. von Makrophagen aufgenommen und gespeichert (Groeneveld und Van Rooijen 1985, Ge et al. 1994, Goodlad und Macartney 1995). Groeneveld et al. (1986) beobachteten bei den Makrophagen der roten Pulpa nach einem kurzfristigen Abfall einen deutlichen Anstieg der Aktivität der sauren Phosphatase achtundvierzig Stunden nach LPS-Stimulation. Andere Untersuchungen dieser Zellen z.B. über die Phagozytose von Kohlepartikeln oder die Produktion freier Sauerstoffradikale nach LPS-Stimulation weisen ebenfalls auf eine Aktivierung der Zellen hin und bestätigten damit die hier dargestellten histopathologischen Beobachtungen. Allerdings wird in erster Linie die Aktivierung der Makrophagen in der weißen Pulpa als bedeutungsvoll für die LPS-bedingten Schädigungen angesehen (Groeneveld und Van Rooijen 1985, Shiratori et al. 1990a), während für die Makrophagen der roten Pulpa eher eine Filterfunktion vermutet wird (Humphrey 1981, Van Rooijen et al. 1989a, 1989b).

Bei Vergleich der Therapiegruppen ließ sich im vorliegenden Versuch kein Unterschied in der Größe der Makrophagen der roten Pulpa oder ein Bezug auf die Ausprägung der Leberschädigung erkennen.

Die Veränderung der Expression der Antigene F4/80 und MAC-1 hingegen weist substanzabhängige Unterschiede auf. Die mit dem Marker F4/80 reagierenden Zellen in der roten Pulpa zeigten nach vierundzwanzig Stunden in allen Gruppen eine Verstärkung der Expression des Antigens, die sich aber von der LPS- über die Imexon- zur Dexamethason-Gruppe deutlich steigert und sich somit wie die Veränderungen der Lymphozyten und der Makrophagen in anderen Milzkompartimenten gegenläufig zur Stärke der LPS-induzierten Schädigung der Leber verhält. Das F4/80-Antigen hat eine Bedeutung bei Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen von immunologischen Reaktionen und kann bei Makrophagen die Bildung von Zytokinen beeinflussen (Warschkau und Kiderlen 1999). Über die Bedeutung der Expressionssteigerung des F4/80-Antigens hinsichtlich einer Beteiligung der Makrophagen der roten Pulpa an LPS-bedingten Veränderungen kann aber wegen der mangelnden Information über die Funktion des Antigens (vgl. Kap. 2.5.2.2) im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Aussage gemacht werden. Auch die Reaktion mit dem Marker MAC-1 war in allen Therapiegruppen verstärkt. Unter dem Einfluss von Imexon kam es zu einer leichten zusätzlichen Verstärkung der Expression dieses Antigens, dessen Anstieg v.a. Ausdruck von Phagozytoseaktivität und Aktivierung ist (vgl. Kap. 2.5.2.1). Dies könnte als weiterer Hinweis auf die Makrophagen aktivierende Wirkung dieser Substanz gewertet werden (vgl. Kap. 5.6.2.1.1.3, Kap. 5.6.2.1.2.3).

5.6.2.2.2 Marginalzone

Auch in der Marginalzone war zu diesem Zeitpunkt bei Färbung mit Hämatoxylin-Eosin in allen Therapiegruppen eine Lymphozytenrepopulation zu erkennen. Eine Reversion der Marginalzonendepletion nach LPS-Stimulation ist in verschiedenen Untersuchungen der Milz beschrieben worden (Groeneveld et al. 1985, 1986, Liu et al. 1991). Allerdings wurde die Repopulation in Abhängigkeit von der LPS-Dosis zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet. Während bei einer Dosis von 250 µg/ Tier i.v. (Groeneveld et al. 1988) die Marginalzone nach vierundzwanzig Stunden noch eine vollständige Depletion zeigte, wurden bei einer Dosierung von 100 µg/ Tier i.v. bereits zum selben Zeitpunkt (Groeneveld et al. 1985) spätestens aber nach achtundvierzig Stunden (Groeneveld et al. 1986) Anzeichen für eine Repopulation gefunden. Als minimale Dosis zur Auslösung einer Depletion wird eine Dosierung von 7 µg/ Tier i.v. angegeben (Groeneveld et al. 1983). Im vorliegenden Versuch wurde vermittels einer Dosis von umgerechnet 1,2 µg/ Tier i.p. in Kombination mit GalN eine deutliche Marginalzonendepletion induziert. Die Repopulation war aber mit dieser niedrigen Dosierung nach vierundzwanzig Stunden auch schon weiter fortgeschritten als in den oben genannten Versuchen. Sie war bei den scheinbehandelten Tieren auch in der klassischen Histologie deutlich sichtbar, unter dem Einfluss von Imexon, wenn auch mit großer Streubreite, verstärkt und erreichte in der Dexamethason-Gruppe ihre maximale Ausprägung. Die immunhistologische Differenzierung der Zellen zeigte, dass an dieser Repopulation alle Lymphozytenpopulationen und auch Makrophagen beteiligt sind.

5.6.2.2.2.1 T-Lymphozyten

Alle dargestellten T-Zellsubpopulationen zeigten in den drei verschiedenen Therapiegruppen eine Zunahme in gleicher Abstufung, d.h. die Stärke der Repopulation in der Marginalzone nahm von der LPS- über die Imexon- zur Dexamethason-Gruppe hin zu. Damit stimmt die Entwicklung der T-Zellzahl in diesem Kompartiment in der Tendenz mit der Entwicklung der Zahl der B-Zellen in der Marginalzone, aber auch der Zahl von B- und T-Lymphozyten in der roten Pulpa überein. Wie die Depletion nach sieben Stunden könnte demnach die Repopulation auf die Rückbildung hämatologischer oder hämodynamischer Veränderungen in der Milz (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.1) oder auf die Wiederherstellung einer intakten Marginalzonenstruktur und die dadurch bedingte Wiederansiedlung der T-Lymphozyten zurückzuführen sein (Groeneveld et al. 1986, vgl. auch Kap. 5.6.2.2.2.3).

5.6.2.2.2 B-Lymphozyten

Die Wanderung der B-Lymphozyten aus der Marginalzone in den Follikel nach LPS-Stimulation ist ein LPS-spezifisches Phänomen (Groeneveld et al. 1983). Sie scheint mit den toxischen Eigenschaften des LPS-Moleküls in Zusammenhang zu stehen (Groeneveld et al. 1985) und ist nicht antigenspezifisch (Liu et al. 1991). Sie bildet sich nach relativ kurzer Zeit zurück (Groeneveld et al. 1985, Liu et al. 1991). Diese Repopulation ist auch in der vorliegenden Untersuchung bei allen Tieren der LPS-Gruppe unabhängig von der Art der histologischen Darstellung deutlich erkennbar. Ihr zeitlicher Verlauf scheint u.a. von der LPS-Dosis abhängig zu sein (vgl. Kap. 5.6.2.2.2), was einen Zusammenhang mit dem Grad der Schädigung der Marginalzone, insbesondere der ansässigen Makrophagen durch LPS (Groeneveld und Van Rooijen 1985, Groeneveld et al. 1986) nahelegen würde. Allerdings wurde festgestellt, dass die Abwanderung der B-Lymphozyten zeitlich vor einer sichtbaren Schädigung des Umfeldes in der Marginalzone bzw. der Abnahme der Marginalzonenmakrophagen einsetzt (Groeneveld et al. 1986) und eine Repopulation der Marginalzone mit Lymphozyten nach DMDP-Liposomen-induzierter Depletion vor der Wiederansiedlung von Makrophagen möglich ist (Van Rooijen et al. 1989a). Im vorliegenden Versuch entwickeln sich die Veränderungen der Lymphozyten und Makrophagen zum frühen und späten Untersuchungszeitpunkt parallel, d. h. auf eine geringere Depletion von Lymphozyten und Makrophagen der Marginalzone erfolgt eine schnellere Repopulation. Eine geringere Vorschädigung der Marginalzone führt also zu einer schnelleren Repopulation, wobei keine Aussage in Bezug auf zeitliche Abfolge der Repopulation der einzelnen betroffenen Zellarten gemacht werden kann.

Während bei Tieren der LPS-Gruppe die Marginalzone meist nur als schmaler Zellsaum erscheint, stellt sie sich in der Imexon-Gruppe als mehrlagiger lockerer Zellgürtel dar, der in seiner Breite aber von Tier zu Tier starke Unterschiede aufweist. Wie bei der Depletion nach sieben Stunden scheint der Einfluss von Imexon auf die Repopulation der B-Lymphozyten der Marginalzone in Abhängigkeit von der immunologischen Reaktionsbereitschaft des jeweiligen Tieres starken Schwankungen zu unterliegen. Im Durchschnitt der Gruppe ist aber ein positiver Einfluss der Substanz im Sinne einer ausgeprägteren Repopulation der Marginalzone mit B-Lymphozyten deutlich zu erkennen.

Nur nach Behandlung mit Dexamethason waren Zellreichtum und Breite der Marginalzone bei Markierung der B-Lymphozyten auffällig vergrößert und übertrafen bei vielen Tieren sogar die der Kontrolltiere. Die B-Lymphozyten der Marginalzone reagieren schneller und stärker auf Stimulation mit LPS als andere B-Lymphozytenpopulationen, z.B. die in den Follikeln der Milz oder in Lymphknoten. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass dafür vor allem die Mikroumgebung bzw. die ansässigen Makrophagen verantwortlich sind (Yokochi

et al. 1990, Snapper et al. 1993). In der Dexamethason-Gruppe ist die Zahl der Marginalzonenmakrophagen sowohl nach sieben als auch nach vierundzwanzig Stunden weniger reduziert als in den beiden anderen Therapiegruppen (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.3), die marginalmetallophilen Makrophagen scheinen früher in ihre ursprüngliche Lokalisation zurückzukehren (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.3) und auch die Follikelmakrophagen sind in ihrer Aktivität beeinflusst (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.2 und Kap. 5.6.2.2.3.2). Möglicherweise trägt die frühzeitigere Wiederherstellung der Marginalzonenstruktur in Kombination mit einer Beeinflussung der Makrophagenaktivierung zu einer verstärkten Ansiedlung von Lymphozyten bei. Außerdem induzieren Glukokortikoide den Untergang von B-Zellen (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.1). Als Folge wurde auch eine Umverteilung dieser Zellen in Form einer Auffüllung von zugrunde gegangenen Zellen zumindest für das Knochenmark beschrieben (Sabbele et al. 1987). Analog wandern möglicherweise im vorliegenden Modell B-Lymphozyten aufgrund der verstärkten Apoptoseinzidenz in den Follikeln unter dem Einfluss von Dexamethason in dieser Therapiegruppe vermehrt in die Milz ein.

5.6.2.2.2.3 Makrophagen

Parallel zur Lymphozytenrepopulation konnte im vorliegenden Versuch nach vierundzwanzig Stunden auch eine Repopulation der Marginalzonenmakrophagen, dargestellt mit dem Antikörper ER-TR9, beobachtet werden. Groeneveld et al. (1986, 1988) beschreiben bei Untersuchungen der Milz nach LPS-Stimulation Depletion und Repopulation der Marginalzonenmakrophagen in gleichem zeitlichen Verlauf wie die der B-Lymphozyten (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.2), wobei für die Makrophagen eine toxische Schädigung als Ursache der Depletion vermutet wird (Groeneveld und Van Rooijen 1985, Groeneveld et al. 1986). Die Bedeutung der Makrophagenrepopulation für die Mikroumgebung in der Marginalzone und die Wiederansiedlung der Lymphozyten liegt aber ist noch unklar (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.2).

Neben einer Zunahme der Zahl der Marginalzonenmakrophagen (ER-TR9) waren in allen Gruppen eine extreme Vergrößerung der Zellen und deutliche Anzeichen von Phagozytose zu erkennen. Gleiches war auch bei der mit dem Antikörper MOMA-2 reagierenden Subpopulation zu erkennen. Sustainsspezifische Unterschiede traten bei keinem der beiden Marker auf.

Groeneveld und Van Rooijen (1985) fanden bei ihrer Untersuchung zur LPS-Lokalisation in der Milz der Maus nach achtundvierzig Stunden, d.h. zu dem Zeitpunkt, zu dem auch die Marginalzonenrepopulation beobachtet wird, nur noch sehr wenig LPS in den Makrophagen der Marginalzone. In Untersuchungen mit anderen empfindlicheren Nachweismethoden (Goodlad und Macartney 1995) bzw. bei Untersuchungen an der Ratte (Ge et al. 1994) wurde aber LPS in den Makrophagen der Marginalzone sieben Tage bzw. bis zu vier Wochen lang

nachgewiesen. Es ist bekannt, dass LPS zu einer Aktivierung der Milzmakrophagen führt (Groeneveld und Van Rooijen 1984, Shiratori et al. 1990b, Ge et al. 1994). Allerdings treten diese Aktivierung und die nachfolgende Zytokinsekretion kurze Zeit nach der LPS-Stimulation ein (Ge et al. 1994, Salkowski et al. 1995). Inwieweit das innerhalb von Makrophagen in zytoplasmatischen Vakuolen konservierte LPS noch eine Aktivierung von Makrophagen oder eine immunologische Reaktion hervorrufen kann, ist nicht klar (Ge et al. 1994).

Die Wiederherstellung des Zellsaumes der marginalmetallophilen Makrophagen (MOMA-1) in ihrer ursprünglichen Lokalisation am inneren Rand der Marginalzone begann in der vorliegenden Arbeit ebenfalls früher als bei Versuchen mit intravenöser Verabreichung von höheren Dosen LPS und ohne die Kombination mit GalN (Groeneveld et al. 1986). Nach vierundzwanzig Stunden waren allerdings in der LPS-Gruppe noch immer einzelne Zellen im Follikel, v.a. in der Korona anzutreffen.

Die vorbeugende Behandlung mit Imexon beeinflusste die Lokalisation der marginalmetallophilen Makrophagen nicht.

In der Dexamethason-Gruppe hingegen waren diese Zellen jetzt fast ausschließlich peripher lokalisiert und entsandten, vergleichbar mit Zellen der Kontrolltiere, nur ihre Ausläufer in die Follikel, d.h. auch die Wiederherstellung des Zellsaumes der marginalmetallophilen Makrophagen trat unter dem Einfluss von Dexamethason früher ein, obwohl nach sieben Stunden Zahl und Lokalisation der marginalmetallophilen Makrophagen denen der anderen beiden Therapiegruppen entsprachen. Da diese Zellen u.a. eine Bedeutung bei der Steuerung der Auswanderung von Lymphozyten aus den Gefäßen und der Verteilung in der Milz haben (Brelinska und Pilgrim 1982, 1983, Groeneveld et al. 1983), wäre ein Zusammenhang zwischen der durch Dexamethason-bedingten Veränderung im Verhalten der MOMA-1-positiven Zellen und der Anhäufung von Lymphozyten in der Marginalzone in dieser Gruppe durchaus denkbar.

Außerdem zeigten auch die marginalmetallophilen Makrophagen eine Aktivierung in Form einer Vergrößerung der Zellen. Wie bereits nach sieben Stunden ist diese Zellvergrößerung unter dem Einfluss von Imexon zusätzlich verstärkt und betrifft mehr Zellen; die zytoplasmatische Expression nimmt zu. Dexamethason verstärkt die Tendenz zur Vergrößerung ebenfalls, hat aber keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression. Dieses Ergebnis bestätigt die Befunderhebung nach sieben Stunden und weist nochmals auf die Makrophagen-aktivierende Wirkung von Imexon hin (vgl. Kap. 5.6.2.1.2.3).

5.6.2.2.3 Follikel

5.6.2.2.3.1 Lymphozyten

Nach vierundzwanzig Stunden reichte die IgM-Expression der B-Lymphozyten im Follikel bei allen Therapiegruppen noch immer fast an die der Marginalzonenlymphozyten heran. Bei der morphometrischen Untersuchung ergab sich für die Follikel in der LPS-Gruppe eine leichte Vergrößerung gegenüber der Kontrollgruppe, diese war allerdings weniger ausgeprägt als nach sieben Stunden und nur für den kleinsten Durchmesser (vgl. Kap. 3.1.6.7) signifikant. In der Literatur wird nach vorangegangener Depletion der Marginalzone durch LPS die Repopulation in Abhängigkeit von der LPS-Dosierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten beschrieben (Groeneveld et al. 1985, 1988). Groeneveld et al. (1985) fanden nach vierundzwanzig Stunden gleichzeitig mit beginnender Repopulation der Marginalzone auch die maximale Vergrößerung der B-Zellfollikel, während in der vorliegenden Arbeit die Repopulation vierundzwanzig Stunden nach LPS-Stimulation mit einer Verkleinerung der Follikel einhergeht. Allerdings wurde hier auch wegen der Kombination mit GalN eine deutlich geringere LPS-Dosis verabreicht als in oben genannter Untersuchung, was den zeitlichen Ablauf sowie auch das Ausmaß der B-Zellwanderung beeinflussen könnte. In der vorliegenden Untersuchung korrelieren die Zellzahlen in Follikel und Marginalzone negativ. Liu et al. (1991) kommen bei der Beurteilung von Follikel und Marginalzone zwei Tage nach Stimulation mit TNP-LPS zu dem Ergebnis, dass sich der Prozess der B-Zellwanderung aus der Marginalzone in die Follikel zu diesem Zeitpunkt umkehrt, was die negative Korrelation beider Parameter erklären würde. Andererseits könnte die Verkleinerung der Follikel in der vorliegenden Untersuchung auch durch die verstärkte Apoptoseneigung bedingt sein (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.3).

Der Einfluss von Imexon auf die Ausdehnung der Follikel war mit den durchgeführten morphometrischen Messungen nicht darstellbar, obwohl die B-Lymphozytenzahl der Marginalzone nach Behandlung mit Imexon stärker zugenommen hat als ohne zusätzliche Behandlung.

Demgegenüber kam es in der Dexamethason-Gruppe zu einer signifikanten Verkleinerung der Follikel, die damit in ihrer Ausdehnung denen der Kontrollgruppe entsprachen oder sogar noch kleiner waren. Auch in dieser Therapiegruppe korrelierten demnach die Zahlen der Lymphozyten in Follikel und Marginalzone negativ. Bei der Wirkung von Dexamethason auf die B-Lymphozyten der Milz steht die Depletion bzw. der Untergang von Zellen im Vordergrund, während der Anteil der LPS-reaktiven Zellen an den B-Zellen und deren Aktivierung durch LPS durch die vorhergehende Behandlung mit Dexamethason nicht beeinträchtigt wird (Sabbe et al. 1987). Im vorliegenden Versuch traten unter dem Einfluss von Dexamethason nach sieben Stunden gehäuft apoptotische Zellen auf, was zur Verkleinerung der Follikel beigetragen haben könnte. Andererseits spielt bei der Aktivierung

von B-Zellen durch LPS in vivo die Mikroumgebung eine große Rolle (Yokochi et al. 1990, Snapper et al. 1993), so dass die Beeinflussung der Makrophagenaktivität in Follikel und Marginalzone (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.3) auch für eine evtl. Abwanderung von Zellen aus dem Follikel von Bedeutung sein könnte.

5.6.2.2.3.2 Makrophagen

Einige MOMA-1-positive Makrophagen waren sowohl in der LPS- als auch in der Imexon-Gruppe auch zu diesem Zeitpunkt noch im Follikel, v.a. in der Korona, anzutreffen, während die Zellen nach Behandlung mit Dexamethason fast ausschließlich an der Follikelperipherie lokalisiert waren (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.3). Dexamethason scheint demnach einen Einfluss auf das Verhalten dieser LPS-sensitiven Makrophagenpopulation zu haben, der mit dem veränderten Verhalten der LPS-sensitiven Lymphozyten in dieser Therapiegruppe in Zusammenhang stehen könnte (vgl. Kap. 5.6.2.2.3.1).

Bei Darstellung mit dem Antikörper MOMA-2 waren in den Follikeln der scheinbehandelten Tiere die Makrophagen noch immer vergrößert und abgerundet.

In der Imexon- und noch stärker in der Dexamethason-Gruppe war die Zahl der aktivierten Makrophagen deutlich zurückgegangen. Die Makrophagenaktivität korrelierte zu diesem Zeitpunkt eher mit dem Rückgang der LPS-induzierten Veränderungen bzw. der Repopulation der Marginalzone als mit der Apoptosehäufigkeit (vgl. Kap. 5.6.2.2.3.3). Dieses Ergebnis bestärkt die Vermutung über einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von B-Lymphozyten der Marginalzone und Makrophagen im Follikel (vgl. Kap. 5.6.2.1.3.2) und bestätigt die Befunderhebung über eine schnellere Rückbildung der LPS-bedingten Veränderungen in der Marginalzone unter Einfluss von Imexon und Dexamethason (vgl. Kap. 5.6.2.2.2.2).

5.6.2.2.3.3 Apoptosen

Apoptosen traten im Follikel in der LPS- und in der Dexamethason-Gruppe nur noch ganz vereinzelt, nach Vorbehandlung mit Imexon geringgradig verstärkt auf. Bei Langzeittherapie mit Imexon im MRL lpr/lpr-Mausmodell kam es zur Reduktion der B-Lymphozyten in der Milz, die sich histopathologisch v.a. in einer Depletion der B-Zellfollikel darstellte (Steger 1993). In vitro wirkt Imexon bei lymphoiden Tumorzelllinien und Mitogen-stimulierten Lymphozyten antiproliferativ und in höheren Dosen auch zytotoxisch (Hersh et al. 1992). Bei Myelomzellen ist der Imexon-induzierte Zelltod als apoptotisch identifiziert worden (Dvorakova et al. 2000). Die wenn auch geringe Zunahme von apoptotischen Zellen in der Imexon-Gruppe im vorliegenden Versuch lässt vermuten, dass bereits die einmalige Verabreichung von Imexon ausreichend ist, um auch bei B-Zellen eine Sensibilisierung gegenüber Apoptose zu

bewirken, wobei die Stimulation mit LPS als Mitogen, evtl. auch über eine Hemmung der Bcl-2-Expression (Yokochi et al. 1996), die Zellen für Imexon-induzierte Apoptose sensibilisieren könnte (Hersh et al. 1992, Dvorakova et al. 2000).

5.6.2.2.4 PALS

In der PALS war die Zelldichte nach vierundzwanzig Stunden bei Färbung mit H.E. nur noch bei Tieren der LPS-Gruppe gegenüber den Kontrolltieren erkennbar vermindert.

5.6.2.2.4.1 T-Lymphozyten

Die Zahl der T-Gesamtlymphozyten (Thy-1.2) schien v.a. in der LPS-Gruppe etwas weniger zugenommen zu haben als die Zelldichte bei Auswertung mit klassischer Histologie. Es war aber auch hier eine deutliche Zunahme zu vermerken. Die Milz-FACS-Analyse bestätigte die Rückbildung der LPS-bedingten Veränderungen der T-Zellen: es war zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Abweichung des Anteils der T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten mehr vorhanden (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.1 und Kap. 5.6.1). Untersuchungen von Shiratori et al. (1990a) über die Bedeutung von LPS-aktivierten Milzzellen für die Leberschädigung nach fünfzehn bis achtzehn Stunden deuten darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt v.a. adhärente Zellen, d.h. Makrophagen, nicht aber Milzlymphozyten das GalN/LPS-induzierte Geschehen in der Leber beeinflussen.

Bei der weiteren Differenzierung der T-Zellen wurde klar, dass die Verminderung der Zellzahl auch zu diesem Zeitpunkt v.a. die T-Helferzellen betraf, während bei der Subpopulation der zytotoxischen und T-Suppressorzellen keine einheitliche Tendenz in der Entwicklung der Zellzahl zu erkennen war. (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.1).

Groeneveld und Van Rooijen (1984) fanden bei ihren Untersuchungen der PALS nach Stimulation mit LPS ohne GalN ein Fortschreiten der Depletion der T-Lymphozyten bis zur achtundvierzigsten Stunde post injectionem. Gleichzeitig wurde auch eine Abnahme der dendritischen Zellen beschrieben (Groeneveld et al. 1986, De Smedt et al. 1996, vgl. auch Kap. 5.6.2.1.4.1). Auch in der Vergleichsgruppe für die Verabreichung von LPS ohne GalN im vorliegenden Versuch war die Rückbildung der Veränderungen weniger stark vorangeschritten. Ähnlich wie in der roten Pulpa und im Follikel scheint es durch die Kombination mit GalN zu einer geringeren Ausprägung oder früheren Rückbildung der Veränderungen zu kommen (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.1 und Kap. 5.6.2.2.3.1).

Die einzelnen Therapiegruppen unterschieden sich im Hinblick auf die Dichte der T-Zellen zu diesem Zeitpunkt nur wenig. Während bei Beurteilung der T-Gesamt-Zellen die Zunahme nur

in der LPS-Gruppe etwas geringer schien, war die Zahl der T-Helferzellen auch bei Tieren der Dexamethason-Gruppe noch geringgradig reduziert. Nach Behandlung mit Imexon war bei Darstellung mit beiden Markern kaum eine Abweichung von Tieren der Kontrollgruppe erkennbar. Die Zunahme der Zellzahl in den verschiedenen Gruppen entspricht damit in etwa dem Ausmaß der Depletion nach sieben Stunden (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.1).

5.6.2.2.4.2 B-Lymphozyten

Die Zahl der B-Lymphozyten in der PALS gleicht in allen drei Therapiegruppen der der Kontrolltiere. Damit entspricht die Entwicklung dieser Zellpopulation der der anderen Lymphozytenpopulationen der PALS. Eine Zunahme von B-Zellen wie sie von Groeneveld et al. (1985) im Zusammenhang mit der Follikelexpansion vierundzwanzig bzw. achtundvierzig Stunden nach LPS-Stimulation gefunden wurde, war im vorliegenden Versuch nicht zu erkennen (vgl. Kap. 5.6.2.2.3.1).

5.6.2.2.4.3 Makrophagen

Die Makrophagen der PALS (MOMA-2) zeigten zu diesem Zeitpunkt in der LPS-Gruppe eine deutliche Aktivierung. Groeneveld und Van Rooijen 1984 fanden nach zwölf und verstärkt nach vierundzwanzig bis achtundvierzig Stunden eine Hemmung der Phagozytose von Kohlepartikeln in diesem Milzkompartiment. Die Ursache der verminderten Aufnahme von Kohlepartikeln bzw. die Bedeutung des veränderten Phagozytoseverhaltens dieser Zellen im LPS-induzierten Geschehen ist nicht klar. Es wurde vermutet, dass die Veränderung sekundär durch eine verstärkte Phagozytose durch andere vorgeschaltete Makrophagen bzw. durch eine kompetitive Hemmung aufgrund der vermehrten Aufnahme untergegangener Lymphozyten bedingt wird, also keine direkte Hemmung der Makrophagen vorliegt (Groeneveld und Van Rooijen 1984). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Aktivierung der Zellen hin, die aber im Hinblick auf die geringe Zahl an Zelluntergängen zu diesem Zeitpunkt (vgl. Kap. 5.6.2.2.4.4) nicht mit der Phagozytose von Lymphozyten in Zusammenhang zu stehen scheint.

Die vorbeugende Behandlung mit Imexon beeinflusste diese LPS-bedingte Veränderung der Makrophagenaktivität nicht, obwohl die Auswirkungen auf andere Zellpopulationen in diesem Kompartiment unter Einfluss der Substanz gehemmt zu sein schienen.

Unter dem Einfluss von Dexamethason war die Aktivierung der Makrophagen nach vierundzwanzig Stunden gehemmt. Die Hemmung der Makrophagenaktivität steht in Einklang mit einer Hemmung anderer LPS-induzierten Veränderungen in diesem Kompartiment

(vgl. Kap. 5.6.2.1.4.1 und Kap. 5.6.2.1.4.2) und dem Rückgang der Apoptoseinzidenz in dieser Gruppe nach vierundzwanzig Stunden (vgl. Kap. 5.6.2.1.4.4 und Kap. 5.6.2.2.4.4).

5.6.2.2.4.4 Apoptosen

Die Apoptoseinzidenz war vierundzwanzig Stunden nach Stimulation mit GalN/LPS kaum noch erhöht. Auch dieses Ergebnis weist auf Glukokortikoide als Apoptose auslösende Mediatoren hin, da die Erhöhung des Kortikosteron-Plasmaspiegels bei vergleichbar niedriger LPS-Dosierung bis etwa zur sechsten Stunde nach LPS-Stimulation andauert (Derijk et al. 1991) und somit nach vierundzwanzig Stunden keine verstärkte Apoptoseneigung zu erwarten wäre. Bei hohen LPS-Dosen, im Milligramm-Bereich dagegen, wurde eine Erhöhung des Kortikosteron-Plasmaspiegels bis zur achtundvierzigsten Stunde nachgewiesen (Norimatsu et al. 1995). Parallel wurde auch ein Fortschreiten der apoptotischen Veränderung in lymphatischen Organen beobachtet (Norimatsu et al. 1995). Im Gegensatz dazu müssten TNF α -induzierte Apoptosen aufgrund des verzögerten Eintritts von Zelluntergängen mit fortschreitender Zeit zunehmen oder überhaupt erst nach achtundvierzig Stunden erkennbar sein (Zheng et al. 1995).

Keine der beiden Versuchssubstanzen beeinflusste die Apoptoseneigung zu diesem Zeitpunkt.

5.7 Abschließende Betrachtung

Als potentiellies Anwendungsgebiet für den Immunmodulator Imexon werden nicht nur Krebs- und Autoimmunerkrankungen, sondern auch bakterielle oder virale Infektionen angesehen, in deren Verlauf immunpathologische Veränderungen eine Rolle spielen (Bicker 1975b, 1978a, Ziegler et al. 1977). Bei der Behandlung einer E.coli-Infektion der Maus mit subtherapeutischen Dosen Chloramphenicol wirkte Imexon z.B. unterstützend (Bicker 1978a, 1980). Die vorliegende Untersuchung wurde durchgeführt, um diese Wirkung von Imexon im GalN/LPS-Hepatitis-Modell, das auf der Wirkung von bakteriellen Endotoxinen beruht, zu verifizieren und die Wirkmechanismen näher zu beleuchten.

Der positive Einfluss von Imexon auf das durch Endotoxin ausgelöste Krankheitsgeschehen konnte auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden: Die Letalität war nach Behandlung mit Imexon um die Hälfte reduziert, die Leberschädigung im Mittel deutlich geringer ausgeprägt. Gleichzeitig war die Wirkung von Imexon auf die untersuchten Parameter, die per se in Abhängigkeit von der individuellen Ausgangssituation deutlich schwanken können, durch eine zusätzliche Verstärkung der Streuung charakterisiert. Eine starke Schwankungsbreite der Imexon-Wirkung in Abhängigkeit von der immunologischen Reaktionsbereitschaft ist auch bei klinischen Studien immer wieder beobachtet worden (Micksche et al. 1978a,

1978b, Hillier 1978). Diese Abhängigkeit der Wirkung von Imexon von der immunologischen Ausgangssituation und Reaktionsbereitschaft des jeweiligen Organismus bestätigte sich auch in der vorliegenden Untersuchung.

Imexon bewirkte im Gegensatz zu der Vergleichssubstanz Dexamethason, deren Wirkung v.a. auf eine Hemmung der Ausschüttung des Hauptmediators $\text{TNF}\alpha$ zurückgeführt wird, keine Hemmung des Anstiegs des $\text{TNF}\alpha$ -Serumspiegels, sondern verstärkte diesen teilweise sogar, wobei diese zusätzliche Erhöhung keinerlei Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf hatte. Für die Imexon-induzierte Hemmung sowohl der Apoptose von Hepatozyten als auch der Auswanderung von Granulozyten aus den Gefäßen in der Leber könnten neben zellulären Veränderungen (siehe unten) aber auch die Reduktion lokaler $\text{TNF}\alpha$ - oder Zytokin-konzentrationen und/oder die Beeinflussung von biochemischen Vorgängen, die distal der $\text{TNF}\alpha$ -Bindung angesiedelt sind, z.B. einer Veränderung zellulärer Redoxsysteme, eine Rolle spielen.

Im Hinblick auf die Angriffspunkte von Imexon bei der Beeinflussung immunologischer Reaktionen ist eine Wirkung auf verschiedene Zellpopulationen nachgewiesen worden. Bei Untersuchungen über einen potentiellen Einsatz von Imexon bei Autoimmunerkrankungen konnte in vitro und in vivo eine selektive B-Zellhemmung sowie die Abnahme Ig-positiver Zellen in der Milz nachgewiesen werden (Haag und Herrmann 1989, Scheuer und Russmann 1989, Franken 1990, Herrmann et al. 1993, Steger 1993). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Maus-Modellen für retrovirale Infektionen erzielt (Morrey et al. 1991, Funk et al. 1992), bei denen gleichzeitig auch eine Steigerung der T-Zellfunktion auftrat (Morrey et al. 1991). Eine Stimulation T-Zell-abhängiger Reaktionen wurde auch im Rahmen der Untersuchung der kanzerostatischen Wirkung von 2-Cyanaziridinen gefunden (Bicker und Hebold 1977b, Bicker 1978b, Micksche et al. 1980). Gleichzeitig wurde hierbei eine Aktivitäts- und Phagozytosesteigerung von Makrophagen beobachtet (Gamsa 1975, Bicker und Hebold 1977b, Bonfert et al. 1977). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Imexon bei entarteten und Mitogen-stimulierten B- aber auch T-Zellen antiproliferativ wirkt (Hersh et al. 1992) und über die Induktion von oxidativem Stress Apoptose auslösen kann (Dvorakova et al. 2000).

In vielen anderen Arbeiten wurde die Wirkung von Imexon nach mehrfacher Verabreichung und/ oder nach mehreren Tagen Wirkdauer untersucht, wobei die Beeinflussung zellvermittelter Immunreaktionen in den Vordergrund trat (Bicker 1975b, 1978b, Ziegler et al. 1977). In der vorliegenden Arbeit ließ sich bei einem hochakuten Krankheitsgeschehen bereits nach wenigen Stunden eine Wirkung von Imexon erkennen, was die Vermutung nahelegt, dass die Substanz nicht nur längerfristig auf zellvermittelte Prozesse und die Zellproliferation wirkt, sondern kurzfristig immunologische Reaktionen möglicherweise über eine Änderung des Antigenprofils auf der Zelloberfläche und/ oder der Phagozytose-tätigkeit und Sekretion immunologischer Mediatoren beeinflusst. Darauf deuten auch substanzspezifische Veränderun-

gen der Morphologie und Antigenexpression einiger Makrophagenpopulationen in der Leber sowie in der roten Pulpa und der Marginalzone der Milz in der vorliegenden Untersuchung hin. Andere Veränderungen bei Milzmakrophagen treten dagegen auch oder verstärkt nach Vorbehandlung mit Dexamethason auf und scheinen eher mit der Stärke der LPS-induzierten Schädigung zusammenzuhängen als substanzspezifisch zu sein. Durch die Aktivierung von Makrophagen wird im allgemeinen die Empfänglichkeit eines Organismus für die toxische Wirkung von Endotoxinen erhöht; es sind aber auch gegenteilige Beobachtungen gemacht worden (Groeneveld et al. 1988). Speziell den Makrophagen der roten Pulpa wird eine Bedeutung bei der Hemmung immunologischer Reaktionen zu gesprochen (Humphrey 1981, Stout und Suttles 1992), so dass eine Aktivierung dieser Zellen unter dem Einfluss von Imexon über eine Art Filterwirkung eine Reduktion der LPS-induzierten Schädigungen bedingen könnte. Im Hinblick auf Zytokine konnte zwar keine Beeinflussung des Serumspiegels von $\text{TNF}\alpha$ (vgl. Kap. 5.4) und IL6 (Deschl 1999) festgestellt werden, was aber eine Veränderung anderer Zytokine oder nachgeschalteter Mediatoren bzw. der lokalen Konzentrationen auch der beiden untersuchten Zytokine als Wirkmechanismus von Imexon nicht völlig ausschließt.

Auch das Verhalten der Granulozyten wurde durch Imexon beeinflusst, wobei die Veränderungen in der Leber aus einem erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Serumspiegel und dem geringeren Ausmaß der Leberschädigung abgeleitet werden können. In der Milz hingegen hemmte Imexon nach sieben Stunden die LPS-induzierte Reduktion der Granulozytenzahl, ohne jedoch eine Konzentrierung um die Marginalzone zu bedingen wie Dexamethason. Nach vierundzwanzig Stunden wurde die Verteilung der Zellen in der roten Pulpa beeinflusst (vgl. Kap. 5.6.2.2.1.2). Eine Bedeutung dieser Veränderungen kann im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht abgeleitet werden.

In einem von dem B-Zellmitogen LPS abhängigen Krankheitsmodell wäre die selektive Hemmung der charakteristischen Veränderungen der B-Zellpopulation zu erwarten gewesen. Imexon reduzierte die LPS-induzierte Wanderung der B-Lymphozyten auch geringgradig und beschleunigte die Rückbildung der Depletion, aber der Vergleich mit der Wirkung von Dexamethason lässt diese Hemmung als sekundär und nicht substanzspezifisch erscheinen. Allerdings ist die Lokalisation der in der Marginalzone verbleibenden B-Lymphozyten, evtl. auch in Abhängigkeit von Makrophagen substanzspezifisch verändert und nach vierundzwanzig Stunden, also zu einem Zeitpunkt, an dem der Beginn eine Mitogen-induzierten Proliferation von Lymphozyten im Follikel beschrieben wurde (Liu et al. 1991), steigt die Apoptoseneigung bei den mit Imexon behandelten Tieren leicht an. Diese Beeinflussung von B-Zellen durch Imexon hatte aber keine erkennbaren Auswirkungen auf das GalN/LPS-induzierte Krankheitsgeschehen. Der Wirkmechanismus von Imexon im GalN/LPS-Hepatitis-Modell scheint nicht primär mit der B-Zell-hemmenden Wirkung der Substanz in Zusammenhang zu stehen.

Auch die Hemmung der Abwanderung von T-Zellen aus der PALS scheint eher sekundär zu sein. Ein Hinweis auf eine Stimulierung von T-Suppressorzellen, deren Bedeutung als Wirkmechanismus der 2-Cyanaziridine im LPS-induzierten Geschehen postuliert wurde (Bicker 1975b), konnte nicht gefunden werden. Wie bei den B-Lymphozyten, allerdings zu einem früheren Zeitpunkt konnte auch in der PALS eine geringgradige Steigerung der Apoptoseneigung beobachtet werden, die möglicherweise ebenfalls mit einer LPS-stimulierten Proliferation, in diesem Fall der T-Zellsubpopulation der zytotoxischen und T-Suppressorzellen in der Milz, in Zusammenhang steht (Vogel et al. 1983). Imexon scheint demnach auch nach einmaliger Behandlung und in einem kurzen Untersuchungszeitraum bei proliferierenden Lymphozyten Apoptose zu induzieren. Das geringe Ausmaß dieser Veränderung lässt aber keinen ursächlichen Zusammenhang mit der Hemmung des LPS-induzierten Geschehens im vorliegenden Versuch vermuten.

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für eine Charakterisierung der Imexon-Wirkung ist die Abnahme des Anteils der B220-CD3-doppelt-negativen Lymphozyten sowohl im Blut als auch in der Milz. Zur Beurteilung der Bedeutung dieser Veränderung wäre allerdings eine genauere Spezifizierung der Zellen bzw. der an dieser Verschiebung beteiligten Zellpopulationen nötig.

Obwohl Imexon nicht bei allen Tieren vor der letalen Wirkung von GalN/LPS schützen konnte, kann aufgrund der geringeren Letalität und der Hemmung der Leberschädigungen von einem Therapie-Erfolg gesprochen werden. Interessant ist hierbei v.a. die frühzeitige Wirkung in einem akuten Krankheitsgeschehen, die die Substanz einerseits für den Einsatz als Adjuvans auch bei akuten Infektionen und Sepsis prädisponiert und andererseits erneut (Morrey et al. 1992) die Frage nach weiteren Angriffspunkten von Imexon, neben Apoptoseinduktion und Veränderung von Lymphozytenfunktionen, auch bei chronischen immunologischen Störungen wie retroviralen Infektionen oder Autoimmunerkrankungen aufwirft, in deren Verlauf Veränderungen z.B. von Zytokinprofilen oder Antigenexpression von Bedeutung sind (Jacob und McDevitt 1988, Hersh 1991, Zhou et al. 1996).

6 Zusammenfassung

Anhand des Einflusses auf den Krankheitsverlauf des GalN/LPS-Modells der Maus wurde die potentielle Bedeutung des 2-Cyanaziridins Imexon als unterstützendes Therapeutikum für systemische bakterielle Infektionen und den septischen Schock untersucht.

Das GalN/LPS-Modell ist gekennzeichnet durch einen hochakuten Verlauf. Todesfälle treten innerhalb der ersten fünf bis neun Stunden nach Injektion der Toxine auf. Imexon senkte die Zahl der Todesfälle im vorliegenden Versuch um die Hälfte.

Der Symptomenkomplex des Multi-Organ-Versagens (MODS), das als Folge der systemischen Entzündungsreaktionen im Verlauf einer Sepsis auftritt, ist in diesem Modell auf die selektive Schädigung der durch GalN sensibilisierten Leber reduziert. Die Stärke der Leberschädigung wurde beurteilt anhand des Plasmaspiegels der Transaminasen ASAT und ALAT, histologisch in der Färbung mit H.E. und immunhistologisch mit dem TUNEL-Test zur spezifischen Darstellung von Apoptosen. Imexon beeinflusste die untersuchten Blutparameter positiv und reduzierte das Ausmaß der apoptotischen und nekrotischen Leberschädigung.

Der Pathogenese im GalN/LPS-Modell liegen immunpathologische Mechanismen zugrunde, die auf der Wechselwirkung der bakteriellen Lipopolysaccharide mit Abwehrzellen und -funktionen des betroffenen Organismus basieren. Zur Charakterisierung der Wirkmechanismen von Imexon wurden verschiedene Populationen von Abwehrzellen in Leber und Milz, den in erster Linie am Krankheitsgeschehen beteiligten Organen, immunhistologisch markiert und auf substanzbedingte Veränderungen der Zellen oder Zellverschiebungen hin untersucht. Die Zellverschiebungen wurden zusätzlich mittels zytofluo- und morphometrischer Untersuchungen quantifiziert.

Imexon bewirkte bei verschiedenen Makrophagenpopulationen in der Leber sowie in der roten Pulpa und der Marginalzone der Milz Veränderungen der Morphologie der Einzelzelle und/oder eine Zunahme der Expression des Antigens MAC-1 bzw. eine flächigere Expression der Antigene F4/80 und MOMA-1. Diese Veränderungen sind überwiegend Zeichen einer Aktivierung dieser Zellen und können als Ausdruck der Beeinflussung von Makrophagen durch Imexon gewertet werden.

Außerdem wurden in der Leber durch Vorbehandlung mit Imexon Zellinfiltrationen und Entzündungsreaktionen gehemmt. In der Milz waren sowohl die LPS-spezifische B-Zellwanderung von der Marginalzone in die Follikel als auch die Depletion verschiedener anderer Zellpopulationen reduziert bzw. deren Rückbildung beschleunigt. Diese Veränderungen korrelierten auch unter Einfluss der Vergleichssubstanz Dexamethason mit der Stärke der LPS-

induzierten Leberschädigung und gaben keinen weiteren Hinweis auf die Angriffspunkte der Imexon-Wirkung.

Durch die vorbeugende Behandlung mit Dexamethason konnte ein vollständiger Schutz vor der GalN/LPS-induzierten Leberschädigung erzielt werden. Dexamethason wirkt im GalN/LPS-Modell über eine Hemmung der Ausschüttung des Hauptmediators TNF α . Imexon hingegen hemmte den Anstieg des TNF α -Serumspiegels nicht, sondern führte unter großer Schwankungsbreite in manchen Fällen sogar zu einer zusätzlichen Erhöhung des Zytokin-spiegels. Die therapeutische Wirkung von Imexon war jedoch von der Erhöhung des TNF α -Serumspiegels unabhängig.

Einen anderen Hinweis auf einen möglichen Ansatzpunkt der Wirkung von Imexon ergab die zytofluometrische Analyse von Blut und Milz. In beiden Kompartimenten war jeweils der Anteil einer Zellpopulation mit der Morphologie von Lymphozyten erniedrigt, die weder das B220- noch das CD3-Antigen exprimierte. Diese Veränderung trat nur unter Einfluss von Imexon auf und ist somit als substanzspezifisch anzusehen.

Unter Berücksichtigung v.a. auch der immunhistologischen Ergebnisse kann als ein Wirkmechanismus von Imexon im GalN/LPS-Modell die Beeinflussung von Makrophagen bzw. deren Aktivierung und Oberflächenantigenexpression nach Stimulation mit LPS postuliert werden, die entweder jenseits der Ausschüttung des Hauptmediators TNF α angesiedelt ist oder zumindest vom systemischen Anstieg dieses Zytokins unabhängig ist. Das Verhalten der verschiedenen Lymphozytenpopulationen hingegen schien nicht spezifisch beeinflusst zu werden. Nur die Veränderungen der zytofluometrischen Untersuchungen könnten als Hinweis auf eine Wirkung von Imexon auf diese Zellpopulationen gewertet werden.

Die meisten der untersuchten Parameter waren unter dem Einfluss von Imexon einer besonders breiten Streuung unterworfen. Die Imexon-induzierten Veränderungen zellulärer Reaktionen und ihre Auswirkung auf den Krankheitsverlauf schienen in starkem Maße von der immunologischen Ausgangssituation des Organismus abzuhängen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen Imexon als unterstützendes, immunmodulatorisches Therapeutikum bei Endotoxin-bedingtem Krankheitsgeschehen als geeignet erscheinen. Eine weitergehende Analyse der zellulären Angriffspunkte und der immunologischen Einflussgrößen, die die therapeutische Wirkung der Substanz beschränken, könnten die Sicherheit eines Therapie-Erfolges weiter steigern.

7 Summary

The assumed relevance of the 2-cyanoaziridine Imexon as an adjuvant in systemic bacterial infections and septic shock was investigated by examining the effect of this compound on the course of disease in the GalN/LPS mouse model.

The GalN/LPS model is characterized by the acute nature of the disease. The majority of deaths occur in between the fifth and the ninth hour after the injection of the toxins. In the current study Imexon was found to be able to reduce the number of deaths by half.

Mice develop a selective liver failure instead of the multiple organ dysfunction syndrome (MODS), as seen during sepsis, mice develop a selective liver failure. Hepatic injury was evaluated by the determination of transaminase serum levels and by histological examination. The sections of the liver were stained with H.E. and with the In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL) for immunohistochemical detection of apoptosis. Imexon reduced the activity increase of aspartate transaminase and alanine transaminase, and the number of apoptotic and necrotic cells in the liver.

The pathogenesis of GalN/LPS-hepatitis is based on immunopathological mechanisms involving complex interactions between bacterial lipopolysaccharides and the host immune cells and functions. To characterize the mode of action of Imexon different populations of immunological cells were identified by immunohistological staining procedures in liver and spleen, which were the mostly involved organs in the pathogenesis in this model. These cells and their shifts were examined for histopathological changes specifically influenced by Imexon. Additionally, the cell shifts were quantified by cytofluometric and morphometric studies.

Imexon caused changes of cell morphology within different macrophage populations. The expression of the antigen MAC-1 was increased on the Kupffer cells in the liver, while the expression of the antigens F4/80 and MOMA-1 was spread on macrophage populations of the red pulp and the marginal zone of the spleen. These changes indicate, that the compound augments the activation of these cells.

In addition, Imexon inhibited the infiltration of cells and, at least partially, the inflammatory reactions in the liver. It reduced the LPS specific migration of B-cells from the splenic marginal zone to the follicles and the depletion of different cell populations in the spleen. It also accelerated the regression of these changes. All these changes correlated with the degree of the LPS-induced hepatic injury even, if the mice were pretreated with dexamethasone. Therefore no further information on the mode of action of Imexon could be derived from these results.

The reference compound dexamethasone completely protected against the GalN/LPS-induced hepatic injury. The action of dexamethasone is based on its inhibitory effect on the increase of TNF α serum levels in the GalN/LPS model. Imexon did not inhibit this increase but enhanced its release, at least in some animals, and it increased the mean variation of the TNF α serum level. The protective effect of Imexon was not impaired by this additional increase.

The cytofluometric analysis of blood and spleen revealed a decrease of the percentage of a population of cells similar to lymphocyte that do not stain with none of the monoclonal antibodies B220 and CD3 for each of the two compartments. This phenomenon occurred specifically after the treatment with Imexon and therefore could indicate another possible target of action of this immunomodulatory agent.

Under particular consideration of the current studies histological results, it may be postulated that, in the GalN/LPS model, Imexon influences the functions of macrophages, their activation, and the expression of antigens on the cell surface. This action may take place beyond the secretion of the terminal mediator TNF α or is at least not related to the systemic release of this cytokine. Lymphocyte populations did not appear to be specifically influenced by Imexon in this model except for the changes concerning the results of flow cytometry.

The mean variation of the majority of the examined parameters was considerably increased under the influence of Imexon. The Imexon-induced changes of cellular reactions and their effect on the course of disease seemed to depend to a great extent on the actual immunological state of the host.

The results of the current study indicate, that the immunomodulatory compound Imexon may be of interest as an adjuvant in the treatment of diseases caused by endotoxin. A detailed analysis of its mode of action and of immunological factors that may limit its therapeutic effect could further increase the safety of a successful therapeutic use of Imexon.

8 Literaturverzeichnis

- Alcorn J.M., Fierer J., Chojkier M. (1992):
The acute-phase response protects mice from D-Galactosamine sensitization to endotoxin and tumor necrosis factor α
Hepatology. **15**, 122-129
- Alnemri E.S., Litwack G. (1989):
Glucocorticoid-induced lymphocytolysis is not mediated by an induced endonuclease
J. Biol. Chem. **264**, 4104-4111
- Anderson N.D., Weiss L. (1976):
Lymphocyte traffic in the spleen
Fed. Proc. **35**, 608
- Andrew P., Deng Y., Kaufman S. (2000):
Fluid extravasation from spleen reduces blood volume in endotoxemia
Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. **278**, R60-R65
- Angermüller S., Künstle G., Tiegs G. (1998):
Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice
J. Histochem. Cytochem. **46**, 1175-1183
- Archer L.T. (1986):
Pathologic manifestations of septic shock
In: Proctor R.A. (ed.): Handbook of endotoxin, Vol.4: Clinical aspects of endotoxin shock,
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, New York, Oxford, 18-54
- Arditi M., Zhou J., Dorio R., Rong H.W., Goyert S.M., Kim K.S. (1993):
Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14
Infect. Immun. **61**, 3149-3156
- Armerding D., Katz D.H. (1974):
Activation of T and B lymphocytes in vitro, I. regulatory influence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on specific T-cell helper function
J. Exp. Med. **139**, 24-43
- Asensi V., Kimeno K., Sakumoto M., Nomoto K. (1989):
Treatment of autoimmune MRL/lpr mice with anti-B220 monoclonal antibody reduces the level of anti-DNA antibodies and lymphadenopathies
Immunol. **68**, 204-208
- Ault K.A., Springer T.A. (1981):
Cross-reaction of a rat-anti-mouse phagocyte-specific monoclonal antibody (anti-MAC-1) with human monocytes and natural killer cells
J. Immunol. **126**, 359-364
- Austyn J.M., Gordon S. (1981):
F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage
Eur. J. Immunol. **11**, 805-815
- Babb J.L., Billing P.A., Gans H., Yamaguchi Y. (1983):
Acute hepatotoxin exposure effects lymphoid and accessory cell types in inbred mice
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **174**, 392-400
- Basch R.S., Kadisch J.L. (1977):
Hematopoietic thymocyte precursors: II Properties of the precursors
J. Exp. Med. **145**, 405-419

- Battafarano R.J., Burd R.J., Kurrelmeyer K.M., Ratz C.A., Dunn D.L. (1994):
Inhibition of splenic macrophage tumor necrosis factor α secretion in vivo by
antilipopolysaccharide monoclonal antibodies
Arch. Surg. **129**, 179-186
- Baumann H., Gauldie J. (1994):
The acute phase response
Immunol. Today **15**, 74-80
- Beller D.I., Springer T.A., Schreiber R.D. (1982):
Anti-MAC-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor
J. Exp. Med. **156**, 1000-1009
- Bette M., Schäfer M.K.-H., Van Rooijen N., Weihe E., Fleischer B. (1993):
Distribution and kinetics of superantigen-induced cytokine gene expression in the mouse
spleen
J. Exp. Med. **178**, 1531-1540
- Beutler B., Milsark I.W., Cerami A.C. (1985):
Passive immunisation against cachectin/ tumor necrosis factor protects mice from lethal effect
of endotoxin
Science **229**, 869-871
- Beutler B., Krochin N., Milsark I.W., Luedke C., Cerami A. (1986):
Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance
Science **232**, 977-980
- Beutler B., Cerami A. (1988):
Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator
Annu. Rev. Biochem. **57**, 505-518
- Beutler B., Cerami A. (1989):
The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response
Annu. Rev. Immunol. **7**, 625-655
- Beverley P.C.L., Woody J., Dunkley M., Feldmann M. (1976):
Separation of suppressor and killer T cells by surface phenotype
Nature **262**, 495-497
- Bicker U. (1975a):
N-(2-cyanethylene)-urea -an asparagine analogous cytostatic compound?
Exp. Pathol. **10**, 106-108
- Bicker U. (1975b):
Immunopharmacological properties of 2-cyanaziridine derivatives
In: Chirigos M.A. et Fenichal R.S. (eds.): Immune Modulation, Agents and their
Mechanisms, Marcel Dekker, New York, 447-473
- Bicker U., Fuhse P. (1975):
Carcinostatic action of 2-cyanaziridines against a sarcoma in rats
Exp. Pathol. **10**, 279-284
- Bicker U., Hebold G. (1977a):
Cancerostatic action of the immune-stimulating compound 4-imino-1,3-diazobicyclo-(3,1,0)-
hexane-2-on, BM 06 002, (proposed Inn Imexon) on various transplantation tumors
IRCS Med. Sci. **5**, 428

- Bicker U., Hebold G. (1977b):
Experimentelle Untersuchungen zur Verstärkung der zellvermittelten Immunreaktivität durch 4-Imino-1,3-diazobicyclo-(3.1.0)-hexan-2-on (BM 06.002, Prop.INN Imexon)
Österr. Zeitschr. Onkol. **4**, 55-56
- Bicker U. (1978a):
Biochemische und pharmakologische Eigenschaften neuer 2-substituierter Aziridine
Fortschr. Med. **12**, 661-664
- Bicker U. (1978b):
BM 06 002: A new immunostimulating compound
In: Chirigos M.A. (ed.): Immune Modulation and Control of Neoplasia by Adjuvant Therapy, Raven Press, New York, 389-401
- Bicker U. (1980):
Therapeutic effects of BM 12,531 (Azimexon)
In: Mathe G. et Muggia F.M. (eds.): Cancer Chemo- and Immunopharmacology, 2. Immunopharmacology, relations and general problems, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 147-152
- Bilyk N., Holt P.G. (1991):
The surface phenotypic characterization of lung macrophages in C3H/HeJ mice
Immunol. **74**, 645-651
- Bohlinger I., Leist M., Ganter F., Angermüller S., Tiegs G., Wendel A. (1996):
DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock
Am. J. Pathol. **149**, 1381-1393
- Bone R.C., Fisher C.J., Clemmer T.P., Slotma G.J., Metz C.A., Balk R.A., and the Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group (1987):
A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock
N. Engl. J. Med. **317**, 653-658
- Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M.H., Sibbald W.J. (1992):
Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis
Chest **101**, 1644-1655
- Bonfert B., Bicker U., Hebold G., Maus W. (1977):
Increased phagocytosis of latex particles as sign of activation of macrophages by BM 12 531
IRCS Med. Sci. **5**, 523
- Bopp A. (1995):
Untersuchung des Einflusses von BM 41 209 (Nachfolgesubstanz von Imexon) auf das MRL lpr/lpr-Mausmodell
Med. Vet. Dissertation Univ. Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin
- Breel M., Reina M.E., Kraal G. (1987):
Dendritic cells of the mouse recognized by two monoclonal antibodies
Eur. J. Immunol. **17**, 1555-1559
- Brelinska R., Pilgrim C. (1983):
Macrophages and interdigitating cells; their relationship to migrating lymphocytes in the white pulp of rat spleen
Cell Tissue Res. **233**, 671-688

- Brelinska R., Pilgrim C. (1982):
The significance of the subcompartments of the marginal zone for directing lymphocyte traffic within the splenic pulp of the rat
Cell Tissue Res. **226**, 155-165
- Camara D.S., Caruana J.A., Schwartz K.A., Montes M., Nolan J.P. (1983):
D-Galactosamine liver injury: absorption of endotoxin and protective effect of small bowel and colon resection in rabbits
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **127**, 255-259
- Carson-Jurica M.A., Schrader W.T., O'Malley B.W. (1990):
Steroid receptor family: structure and functions
Endocr. Rev. **11**, 201-220
- Cerni C.M., Rella W.A., Bicker U. (1977):
Immunestimulation by 4-imino-1,3-diazobicyclo (3.1.0)-hexane-2-on (BM 06.002)
Österr. Zeitschr. Onkol. **4**, 20-22
- Cerwenka A., Kovar H., Majdic O., Holter W. (1996):
Fas- and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in the presence of TGF- β 1
J. Immunol. **156**, 459-464
- Chen L.L., Adams J.C., Steinman R.M. (1978):
Anatomy of germinal centers in mouse spleen, with special reference to follicular dendritic cells
J. Cell Biol. **77**, 148-164
- Chensue S.W., Terebuh P.D., Remick D.G., Scales W.E., Kunkel S.L. (1991):
In vivo biologic and immunohistochemical analysis of Interleukin-1 Alpha, Beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia
Am. J. Pathol. **138**, 395-402
- Chirigos M.A., Ussery M.A., Rankin J.T., Herrmann D., Bicker U., Black P.L. (1990):
Antiviral efficacy of imexon in the Rauscher murine retrovirus AIDS model
Immunopharm. Immunotox. **12**, 1-21
- Chirigos M.A., Ussery M.A., Black P.L. (1991):
Imexon and biological response modifiers in murine models of AIDS
Int. J. Immunopharmac. **13** suppl.1, 33-41
- Chojkier M., Fierer J. (1985):
D-Galactosamine hepatotoxicity is associated with endotoxin sensitivity and mediated by lymphoreticular cells in mice
Gastroenterol. **88**, 115-121
- Chosay J.G., Essani N.A., Dunn C.J., Jaeschke H. (1997):
Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury
Am. J. Physiol. **272**, G1195-1200
- Cidlowski J.A., King K.I., Evans-Storms R.B., Montague J.W., Bortner C.D., Hughes F.M. (1995):
The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system
In: Conn P.M. (ed.): Recent progress in hormone research, Proceedings of the Conference 1995, The Endocrine Society, 457-491

- Clinton S.K., Fleet J.C., Loppnow H., Salomon R.N., Clark B.D., Cannon J.G., Shaw A.R., Dinarello C.A., Libby P. (1991):
Interleukin-1 gene expression in the rabbit vascular tissue in vivo
Am. J. Pathol. **138**, 1005-1014
- Coffman R.L., Weissman I.L. (1981a):
A monoclonal antibody that recognizes B-cells and B-cell precursors in mice
J. Exp. Med. **153**, 269-279
- Coffman R.L., Weissman I.L. (1981b):
B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family
Nature **289**, 681-683
- Cohen J.J., Duke R.C. (1992):
Apoptosis and programmed cell death in immunity
Ann. Rev. Immunol. **10**, 267-293
- Colletti L.M., Remick D.G., Burtch G.D., Kunkel S.L., Strieter R.M., Campell D.A. (1990):
Role of TNF α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/ reperfusion injury in the rat
J. Clin. Invest. **85**, 1936-1943
- Compton M.M., Cidlowski J.A. (1987):
Identification of a glucocorticoid-induced nuclease in thymocytes
J. Biol. Chem. **262**, 8288-8292
- Connolly J.M., Hansen T.H., Ingold A.L., Potter T.A. (1990):
Recognition by CD8 on cytotoxic T lymphocytes is ablated by several substitutions in the class I a3 domain: CD8 and the T-cell receptor recognize the same class I molecule
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 2137-2141
- Connolly J.M., Potter T.A., Wormstall E.-M., Hansen T.H. (1988):
The Lyt-2 molecule recognizes residues in the class I a3 domain in allogeneic cytotoxic T cell responses
J. Exp. Med. **168**, 325-341
- Dayar J.-M., Beutler B., Cerami A. (1985):
Cachectin/ tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts
J. Exp. Med. **162**, 2163-2168
- De Kossodo S., Critico B., Grau G.E. (1994):
Modulation of the transcripts for tumor necrosis factor- α and its receptors in vivo
Eur. J. Immunol. **24**, 769-772
- De Simone C., Famularo G., Cifone G., Mitsuya H. (1996):
HIV-1 infection and cellular metabolism
Immunol. Today **17**, 256-258
- De Smedt T., Pajak B., Muraille E., Lespagnard L., Heinen E., De Baetselier P., Urbain J., Leo O., Moser M. (1996):
Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo
J. Exp. Med. **184**, 1413-1424
- Decker K., Keppler D. (1972):
Galactosamine induced liver injury
In: Popper H. et Schaffner F. (eds.): *Progress in Liver Diseases*, Grune & Stratton, Freiburg, 183-199

- Decker K., Keppler D. (1974):
Galactosamine hepatitis: Key role of nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **71**, 78-106
- Decker K., Keppler D., Reutter W. (1995a):
Galaktosamin-Hepatitis als Werkzeug der Zellbiologen und Pharmakologen
In: 25 Jahre Galaktosamin-Hepatitis, Galaktosamin-Hepatitis: Molekularer Mechanismus einer experimentellen Erkrankung, Falk Foundation e.V., Freiburg, 16-17
- Decker K., Keppler D., Reutter W. (1995b):
Rolle der Nichtparenchymzellen beim Zustandekommen der Galaktosamin-Hepatitis
In: 25 Jahre Galaktosamin-Hepatitis, Galaktosamin-Hepatitis: Molekularer Mechanismus einer experimentellen Erkrankung, Falk Foundation e.V., Freiburg, 11-16
- Derijk R., Van Rooijen N., Tilders F.J.H., Besedovsky H.O., Rey del A., Berkenbosch F. (1991):
Selective depletion of macrophages prevents pituitary-adrenal activation in response to subpyrogenic, but not to pyrogenic, doses of bacterial endotoxin in rats
Endocrinol. **129**, 330-338
- Deschl U., Dietmann G., Steger B., Juchem R., Schmidt J., Hartig F., Rebel W. (1994):
Immunohistochemische Untersuchungen an der MRL-Maus im Screening von pharmazeutischen Wirkstoffen
7. Tagung der Gesellschaft für Toxikologische Pathologie
7. und 8. Oktober 1993 in Mainz
Exp. Toxic. Pathol. **46**, 94
- Deschl U. (1999):
Pers. Comm. Deschl, Boehringer Mannheim
- Deschl U., Dietmann G., Haag R., Schad A., Haubner S., Rebel W., Fahimi H.D. (1999):
Lipopolysaccharide-induced apoptosis in murine liver
Exp. Toxic. Pathol. **51**, 1
- Dialynas D.P., Quan Z.S., Wall K.A., Pierres A., Quintans J., Loken M.R., Pierres M., Fitch F.W. (1983):
Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule
J. Immunol. **131**, 2445-2451
- Diaz P., Jones D.G., Kay A.B. (1979):
Antiinflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation
Nature **278**, 456-459
- Dijkstra C.D., Van Vliet E., Döpp E.A., Van der Lelij A.A., Kraal G. (1985):
Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno- and enzyme-histochemical properties and functional capacities
Immunol. **55**, 23-30
- Dinareello C.A. (1989):
Interleukin-1 and its related cytokines
In: Sorg C. (ed.): Macrophage-derived cell regulatory factors.
Cytokines, Karger, Basel, 105-154
- DiSanto J.P., Smith D., De Bruin D., Lacy E., Flomenberg N. (1993):
Transcriptional diversity at the duplicated human CD8 β loci
Eur. J. Immunol. **23**, 320-326

- Dixon S.C., Soriano B.J., Lush R.M., Borner M.M., Figg W.D. (1997):
Apoptosis: Its role in the development of malignancies and its potential as a novel therapeutic target
Ann. Pharmacother. **31**, 76-82
- Dorr R.T., Liddil J.D., Dalton W.S., Galler L., Hersh E.M. (1993):
The cyanoaziridine imexon (I) produces protein-linked DNA single strand breaks (SSB) possible by topoisomerase I inhibition
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **34**, 328
- Dorr R.T., Liddil J.D., Klein M.K., Hersh E.M. (1995):
Preclinical pharmacokinetics and antitumor activity of imexon
Invest. New Drugs **13**, 113-116
- Doyle C., Strominger J.L. (1987):
Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion
Nature **330**, 256-259
- Duncan L.M., Meegan L.S., Unanue E.R. (1991):
IL-1 gene expression in lymphoid tissues
J. Immunol. **146**, 565-571
- Dvorakova K., Payne C.M., Tome M.E., Briehl M.M., McClure T., Dorr R.T. (2000):
Induction of oxidative stress and apoptosis in myeloma cells by the aziridine-containing agent imexon
Biochem. Pharmacol. **60**, 749-758
- Eikelenboom P., Dijkstra C.D., Boorsma D.M., Van Rooijen N. (1985):
Characterization of lymphoid and nonlymphoid cells in the white pulp of the spleen using immunoperoxidase techniques and enzyme-histochemistry
Experientia **41**, 209-215
- El-Mofty S.K., Scrutton M.C., Serroni A., Nicolini C., Farber J.L. (1975):
Early, reversible plasma membrane injury in Galactosamine-induced liver cell death
Am. J. Pathol. **79**, 579-596
- Emmerich F. (1988):
Cross-linking of CD4 and CD8 with the T-cell receptor complex: quaternary complex formation and T-cell repertoire selection
Immunol. Today **9**, 296-300
- Essani N.A., Fischer M.A., Farhood A., Mannig A.M., Smith C.W., Jaeschke H. (1995):
Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesions molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure
Hepatology **21**, 1632-1639
- Everhaerd B., Brouckaert P., Shaw A., Fiers W. (1989):
Four different interleukin-1 species sensitized to the lethal action of tumor necrosis factor
Biochem. Biophys. Res. Commun. **163**, 378-385
- Fischer E.H., Tonks N.K., Charbonneau H., Cicirelli M.F., Cool D.E., Diltz C.D., Krebs E.G., Walsh K.A. (1990):
Protein tyrosine phosphatases: a novel family of enzymes involved in transmembrane signalling
In: Nishizuka Y. et al. (eds.): *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, Raven Press, New York, 273-279

- Fong Y., Tracey K.J., Moldawer L.L., Hesse D.G., Manogue K.B., Kenney J.S., Lee A.T., Kuo G.C., Allison A.C., Lowry S.F., Cerami A. (1989):
Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce Interleukin 1 β and Interleukin 6 appearance during lethal bacteremia
J. Exp. Med. **170**, 1627-1633
- Fox E.S., Broitman S.A., Thomas P. (1990):
Biology of disease, Bacterial endotoxin and the liver
Lab. Invest. **63**, 733-741
- Franken M. (1990):
Vergleichende Untersuchung verschiedener Immunsuppressiva, insbesondere Imexon (BM 06 002), auf die B- und T-Zell-Antwort in vitro und in vivo
Med. Dissertation Univ. Heidelberg, Fachbereich Medizin
- Freudenberg M.A., Bög-Hansen T.C., Back U., Galanos C. (1980):
Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats
Infect. Immun. **28**, 373-380
- Freudenberg M.A., Keppler D., Galanos C. (1986):
Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin
Infect. Immun. **51**, 891-895
- Freudenberg M.A., Galanos C. (1988):
Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-Galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages
Infect. Immun. **56**, 1352-1357
- Freudenberg M.A., Galanos C. (1990):
Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action
Int. Rev. Immunol. **6**, 207-221
- Funk C.Y., Eismann J., Hersh E.M. (1992):
Treatment of the murine, retrovirus-induced lymphoproliferative immunodeficiency disease (LP-BM5) in c57BL/10 mice with the immunomodulator imexon
AIDS Res. Hum. Retroviruses **8**, 633-638
- Galanos C., Freudenberg M.A., Reutter W. (1979):
Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5939-5943
- Gamsa D. (1975):
Einfluß von BM 06.002 auf die Aktivierbarkeit von Rattenmakrophagen
Unveröffentlichte Dokumentation, Univ. Heidelberg
- Gantner F., Leist M., Jilg S., Germann P.G., Freudenberg M.A., Tiegs G. (1995):
Tumor necrosis factor-induced hepatic DNA fragmentation as an early marker of T-cell-dependent liver injury in mice
Gastroenterol. **109**, 166-176
- Garvy B.A., Telford W.G., King L.E., Fraker P.J. (1993):
Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry
Immunol. **79**, 270-277

- Ge Y., Ezzell R.M., Tompkins R.G., Shaw Warren H. (1994):
Cellular distribution of endotoxin after injection of chemically purified lipopolysaccharide differs from that after injection of live bacteria
J. Infect. Dis. **169**, 95-104
- Gilbert R.P. (1960):
Mechanisms of the hemodynamic effects of endotoxin
Physiol. Rev. **40**, 245-279
- Gonzalo J.A., Gonzalez-Garcia A., Martinez A.C., Kroemer G. (1993):
Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T-cells in vivo
J. Exp. Med. **177**, 1239-1246
- Goodlad J.R., Macartney J.C. (1995):
Germinal-center cell proliferation in response to T-independent antigens: a stathmokinetic, morphometric and immunohistochemical study in vivo
Eur. J. Immunol. **25**, 1918-1926
- Gordon C., Wofsy D. (1990):
Effects of recombinant murine tumor necrosis factor- α on immune function
J. Immunol. **144**, 1753-1758
- Gordon S., Fraser I., Nath D., Hughes D., Clarke S. (1992):
Macrophages in tissues and in vitro
Curr. Opin. Immunol. **4**, 25-32
- Granucci F., Girolomoni G., Lutz M.B., Foti M., Marconi G., Gnocchi P., Nalli L., Ricciardi-Castagnoli P. (1994):
Modulation of cytokine expression in mouse dendritic cell clones
Eur. J. Immunol. **24**, 2522-2526
- Grasl-Kraupp B., Ruttkay-Nedecky B., Koudelka H., Bukowska K., Bursch W., Schulte-Hermann R. (1995):
In situ detection of fragmented DNA (TUNEL Assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note
Hepatol. **21**, 1465-1468
- Groeneveld P.H.P., Van Rooijen N., Eikelenboom P. (1983):
In vivo effects of lipopolysaccharide on lymphoid and non-lymphoid cells in the mouse spleen, migration of marginal metallophilic cells towards the follicle centres
Cell Tissue Res. **234**, 201-208
- Groeneveld P.H.P., Van Rooijen N. (1984):
In vivo effects of lipopolysaccharide on lymphoid and non-lymphoid cells in the mouse spleen, reduction of T-lymphocytes and phagocytosis in the inner parts of the periarteriolar lymphocyte sheath
Cell Tiss. Res. **236**, 637-642
- Groeneveld P.H.P., Erich T., Kraal G. (1985):
In vivo effects of LPS on B-lymphocyte subpopulations. Migration of marginal zone-lymphocytes and IgD-blast formation in the mouse spleen
Immunobiol. **170**, 402-411
- Groeneveld P.H.P., Van Rooijen N. (1985):
Localization of intravenously injected lipopolysaccharide (LPS) in the spleen of the mouse, an immunoperoxidase and histochemical study
Virchows Arch. **48**, 237-245

- Groeneveld P.H.P., Erich T., Kraal G. (1986):
The differential effects of lipopolysaccharide (LPS) on splenic non-lymphoid cells
demonstrated by monoclonal antibodies
Immunol. **58**, 285-290
- Groeneveld P.H.P., Claassen E., Kuper C.F., Van Rooijen N. (1988):
The role of macrophages in LPS-induced lethality and tissue injury
Immunol. **63**, 521-527
- Grün M., Liehr H., Rasenack U. (1976):
Significance of endotoxemia in experimental "Galactosamine-Hepatitis"
in the rat
Acta Hepato-Gastroenterol. **23**, 64-81
- Haag R., Hermann D.B.C. (1989):
Unveröffentlichte Firmendokumentation, Boehringer Mannheim GmbH
- Hadden J.W., Coffey R.G. (1980):
Effects of BM 12,531 (Azimexon) on in vitro lymphocyte and macrophage proliferation
In: Mathe G. (ed.): Recent results in cancer research, cancer chemo- and
immunopharmacology, Springer Verlag, Heidelberg, 162-164
- Hale J.D., Robinson J.A., Loeb H.S., Gunnar R.M. (1986):
Pathophysiology of endotoxin shock in man
In: Proctor R.A. (ed.): Handbook of endotoxin, Vol.4: Clinical aspects of endotoxin shock,
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, New York, Oxford, 1-17
- Hampton R.Y., Golenbock D.T., Penman M., Krieger M., Raetz C.R.H. (1991):
Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors
Nature **352**, 342-344
- Hartig F. (1975):
Pathomorphologie bei unterschiedlich erworbener Störung der Eukoagulabilität des Blutes bei
verschiedenen Tierspezies
Habilitationsschrift Univ. Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, 123
- Haslett C., Scott Worthen G., Giclas P.C., Morrison D.C., Henson J.E., Henson P.M. (1987):
The pulmonary vascular sequestration of neutrophils in endotoxemia is initiated by an effect
of endotoxin on the neutrophil in the rabbit
Am. Rev. Respir. Dis. **136**, 9-18
- Hathcock K.S. (1991):
T cell depletion by cytotoxic elimination
In: Coligan J.E. et al. (eds.): Current protocols in Immunology, John Wiley and Sons, New
York, 3.4.1-3.4.3
- Heine H., Ulmer A.J., Flad H.-D., Hauschildt S. (1995):
Lipopolysaccharide-induced change of phosphorylation of two cytosolic proteins in human
monocytes is prevented by inhibitors of ADP-ribosylation
J. Immunol. **155**, 4899-4908
- Herrmann D.B.J., Hartig F., Schmitt J., Haag R., Opitz H.G. (1993):
Specific immunosuppression by imexon in experimental autoimmune disease
Immunobiol. (Stuttgart) **189** (1/2), 116
- Hersh E.M., Funk C., Gschwind C., Peterson E.A., Mosier D. (1990):
Imexon alters the course of murine LP- BM5 retrovirus induced lymphoproliferative
immunodeficiency disease
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **31**, 302

- Hersh E.M. (1991):
Current status of immunotherapy of patients with HIV-infection
Int. J. Immunopharm. **13**, Suppl.1, 9-18
- Hersh E.M., Gschwind C.R., Taylor C.W., Dorr R.T., Taetle R., Salmon S.E. (1992):
Antiproliferative and antitumor activity of the 2-cyanoaziridine compound imexon on tumor cell lines and fresh tumor cells in vitro
J. Natl. Cancer Inst. **84**, 1238-1244
- Hersh E.M., Gorgan T.M., Funk C.Y., Taylor C.W. (1993a):
Suppression of human lymphoma development in the severe combined immune- deficient mouse by imexon therapy
J. Immunother. **13**, 77-83
- Hersh E.M., Edwards W.R., Taylor C.W., Dorr T.R., Taetle R., Dalton W.S., Salmon S.E. (1993b):
In-vitro and in-vivo antitumor activity of the cyanoaziridine compound imexon
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **34**, 374
- Hersh E.M., Gorgan T.M., Funk C.Y., Barbuto J.A., Taylor C.W. (1993c):
Imexon reduces the development of human B-cell-lymphoma (HBL) in SCID mice after inoculation of human peripheral blood lymphocytes
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. **12**, 369
- Hersh E.M., Dorr T.R., Curtis R.A., Prince J.E. (1995):
Anti-tumor effects of the 2-cyanoaziridine imexon combined with myelosuppressive and non-myelosuppressive anti-cancer agents
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **36**, 294
- Hillier K. (1978):
BM-06 002 immunostimulant
Drugs Future **3**, 95-96
- Hinshaw L., Peduzzi P., Young E., Sprung C., Shatney C., Sheagren J., Wilson M., Haakenson C. (1987):
Effect of high-dose glucocorticoid therapy on mortality in patients with clinical signs of systemic sepsis
N. Engl. J. Med. **317**, 659-665
- Hiraoka E., Nonami T., Kurokawa T., Kobayashi H., Takagi H. (1995):
The role of the spleen in endotoxin-induced liver injury
Liver **15**, 35-38
- Ho M.-K., Springer T.A. (1982):
MAC-1 antigen: quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen
J. Immunol. **128**, 2281-2286
- Ho M.-K., Springer T.A. (1984):
Preparation and use of monoclonal antimacrophage antibodies
Methods Enzymol. **108**, 313-324
- Hoff F. (1957):
Fieber und unspezifische Abwehrvorgänge, unspezifische Therapie.
Gg. Thieme-Verlag Stuttgart
- Hoffmann R., Grewe M., Estler H.-C., Schulze-Specking A., Decker K. (1994):
Regulation of tumor necrosis factor α - mRNA synthesis and distribution of tumor necrosis factor α -mRNA synthesizing cells in rat liver during experimental endotoxemia
J. Hepatol. **20**, 122-128

- Hogg J.C. (1995):
Leukocyte dynamics in regional circulations
In: Granger D.N. et Schmid-Schönbein G.W. (eds.): Physiology and pathophysiology of leukocyte adhesion, Oxford University Press, Oxford, New York, 294-310
- Hollander N., Pillmer E., Weissman I.L. (1980):
Blocking effect of Lyt-2 antibodies on T cell functions
J. Exp. Med. **152**, 674-687
- Holler E., Kolb H.J., Hintermeier-Knabe R., Mittermüller J., Thierfelder S., Kaul M., Wilmanns W. (1993):
Role of tumor necrosis factor alpha in acute graft-versus-host disease and complications following allogeneic bone marrow transplantation
Transplant. Proc. **25**, 1234-1236
- Holmberg L.A., Ault K.A. (1984):
Characterization of natural killer cells induced in the peritoneal exudates of mice infected with *Listeria monocytogenes*: A study of their tumor target specificity and their expression of murine differentiation antigens and human NK-associated antigens
Cell. Immunol. **89**, 151-168
- Hu H., Möller G. (1994):
Lipopolysaccharide-stimulated events in B-cell activation
Scand. J. Immunol. **40**, 221-227
- Hume D.A., Robinson A.P., MacPherson G.G., Gordon S. (1983):
The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80
J. Exp. Med. **158**, 1522-1536
- Humphrey J.H. (1981):
Tolerogenic or immunogenic activity of hapten-conjugated polysaccharides correlated with cellular localization
Eur. J. Immunol. **11**, 212-220
- Humphrey J.H., Grennan D. (1981):
Different macrophage populations distinguished by means of fluorescent polysaccharides. Recognition and properties of marginal-zone macrophages
Eur. J. Immunol. **11**, 221-228
- Hunt J.S., Chen H.-L., Hu X.-L., Chen T.-Y., Morrison D.C. (1992):
Tumor necrosis factor α expression in the tissues of normal mice
Cytokine **4**, 340-346
- Jaeschke H., Farhood A., Smith C.W. (1990):
Neutrophil-induced hepatocellular injury in endotoxin shock in mice
FASEB J. **4**, A1020
- Jaeschke H., Farhood A., Smith C.W. (1991):
Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism
Am. J. Physiol. **261**, G1051-1056
- Jaeschke H., Ho Y.-S., Fisher M.A., Lawson J.A., Farhood A. (1999):
Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress
Hepatol. **29**, 443-450

- Jacob C.O., McDevitt H.O. (1988):
Tumor necrosis factor α in murine autoimmune 'lupus' nephritis
Nature **331**, 356-358
- Jilg S., Barsig J., Leist M., Küsters S., Volk H.-D., Wendel A. (1996):
Enhanced release of interleukin-10 and soluble tumor necrosis factor receptors as novel principles of methylxanthine action in murine models of endotoxic shock
J. Pharmacol. Exp. Therap. **278**, 421-431
- Jones J.J., Fan J., Nathens A.B., Kapus A., Shekhman M., Marshall J.C., Parodo J., Rotstein O.D. (1999):
Redox manipulation using the thiol-oxidizing agent diethyl maleate prevents hepatocellular necrosis and apoptosis in a rodent endotoxemia model
Hepatology **30**, 714-724
- Jones T.L., Barnett L., Lafrez D. (1994):
Alteration of cell cycle kinetics and immunoglobulin gene transcription as the result of multiple agonist stimulation of murine B cells
Cell. Immunol. **155**, 156-168
- Jotwani R., Tanaka Y., Watanabe K., Tanaka K., Kato N., Ueno K. (1995):
Cytokine stimulation during *Salmonella typhimurium* sepsis in Ity mice
J. Med. Microbiol. **42**, 348-352
- Kakugawa K., Udaka K., Nakashima K., Inaba K., Oka Y., Sugiyama H., Tamamura H., Yamagishi H. (2000):
Efficient induction of peptide-specific cytotoxic T lymphocytes by LPS-activated spleen cells
Microbiol. Immunol. **44**, 123-133
- Karaki S., Tanabe M., Nakauchi H., Takiguchi M. (1992):
B-chain broadens range of CD8 recognition for MHC class I molecule
J. Immunol. **149**, 1613-1618
- Karlsson-Parra A., Ridderstad A., Wallgren A.C., Möller E., Ljunggren H.G., Korsgren O. (1996):
Xenograft rejection of porcine islet-like cell clusters in normal and natural killer cell-depleted mice
Transplantation **61**, 1313-1320
- Keppler D., Lesch R., Reutter W., Decker K. (1968):
Experimental hepatitis induced by D-Galactosamine
Exp. Mol. Pathol. **9**, 279-290
- Klaus S.J., Sidorenko S.P., Clark E.A. (1996):
CD45 ligation induces programmed cell death in T- and B-lymphocytes
J. Immunol. **156**, 2743-2753
- Knudsen P.J., Dinarello C.A., Strom T.B. (1987):
Glucocorticoids inhibit transcriptional expression of Interleukin 1 in U937 cells
J. Immunol. **139**, 4129-4134
- Köhler G., Milstein C. (1976):
Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion
Eur. J. Immunol. **6**, 511-519
- Komatsu Y., Shiratori Y., Kawase T., Hashimoto N., Han K., Shiina S., Matsumura M., Niwa Y., Kato N., Tada M. (1994):
Role of polymorphonuclear leukocytes in galactosamine hepatitis: mechanism of adherence to hepatic endothelial cells
Hepatology **20**, 1548-1556

- Korsmeyer S.J. (1992):
Bcl-2: a repressor of lymphocyte death
Immunol. Today **13**, 285-288
- Kraal G., Janse M. (1986):
Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody
Immunol. **58**, 665-669
- Kraal G., Rep M., Janse M. (1987):
Macrophages in T and B cell compartments and other tissue macrophages recognized by monoclonal antibody MOMA-2
Scand. J. Immunol. **26**, 653-661
- Kraal G., Janse M., Claasen E. (1988):
Marginal metallophilic macrophages in the mouse spleen: effects of neonatal injections of MOMA-1 antibody on the humoral immune response
Immunol. Lett. **17**, 139-144
- Kraal G., Ter Hart H., Meelhuizen C., Venneker G., Claasen E. (1989):
Marginal zone macrophages and their role in the immune response against T-independent type 2 antigens: modulation of the cells with specific antibody
Eur. J. Immunol. **19**, 675-680
- Kürzinger K., Springer T.A. (1982):
Purification and structural characterization of LFA-1, a lymphocyte function-associated antigen, and MAC-1, a related macrophage differentiation antigen associated with the type three complement receptor
J. Biol. Chem. **257**, 12412-12418
- Kull F.C. (1988):
Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids
Biochem. Biophys. Res. Commun. **153**, 402-409
- Lagresle C., Bella C., Daniel P.T., Krammer P.H., Defrance T. (1995):
Regulation of germinal center B cell differentiation, role of human APO-1/ Fas (CD95) molecule
J. Immunol. **154**, 5746-5756
- Laster S.M., Wood J.G., Gooding L.R. (1988):
Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis
J. Immunol. **141**, 2629-2634
- Latta M., Küntle G., Leist M., Wendel A. (2000):
Metabolic depletion of ATP by fructose inversely controls CD95- and TNF-R1-mediated hepatic apoptosis
J. Exp. Med. **191**, 1975-1985
- Lawson J.A., Fisher M.A., Simmons C.A., Farhood A., Jaeschke H. (1998):
Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and FAS-antibody-induced liver injury
Hepatology **28**, 721-767
- Lazar G., Duda E. (1992):
Effect of RU 38486 on TNF production and toxicity
FEBS **308**, 137-140

- Le J., Vilcek J. (1989):
Biology of disease, Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response
Lab. Invest. **61**, 588-602
- Ledbetter J.A., Herzenberg L.A. (1979):
Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens
Immunol. Rev. **47**, 63-90
- Ledbetter J.A., Rouse R.V., Micklem H.S., Herzenberg L.A. (1980):
T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens
J. Exp. Med. **152**, 280-295
- Ledbetter J.A., Seaman W.E., Tsu T.T., Herzenberg L.A. (1981):
Lyt-2 and Lyt-3 antigens are on two different polypeptide subunits linked by disulfide bonds, relationship of subunits to T-cell cytolytic activity
J. Exp. Med. **153**, 1503-1516
- Lee S.-H., Starkey P.M., Gordon S. (1985):
Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues
J. Exp. Med. **161**, 475-489
- Lee S.-H., Crocker P., Gordon S. (1986):
Macrophage plasma membrane and secretory properties in murine malaria
J. Exp. Med. **163**, 54-74
- Lee S.-H., Tsou A.-P., Chan H., Thomas J., Petrie K., Eugui E.M., Allison A.C. (1988):
Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the Interleukin 1 β gene and decrease the stability of Interleukin 1 β m RNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 1204-1208
- Lehmann V., Freudenberg M.A., Galanos C. (1987):
Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-Galactosamine-treated mice
J. Exp. Med. **165**, 657-663
- Lehmann V., Benninghoff B., Dröge W. (1988):
Tumor necrosis factor-induced activation of peritoneal macrophages is regulated by prostaglandin E2 and cAMP
J. Immunol. **141**, 587-591
- Lei M.-G., Morrison D.C. (1988a):
Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes
I. Detection of lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulations
J. Immunol. **141**, 996-1005
- Lei M.-G., Morrison D.C. (1988b):
Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes II. Membrane localization and binding characteristics
J. Immunol. **141**, 1006-1011
- Lei M.-G., Stimpson S.A., Morrison D.C. (1991):
Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding receptors on murine splenocytes (III)
J. Immunol. **147**, 1925-1932

- Leist M., Gantner F., Böhlinger I., Germann P.G., Tiegs G., Wendel A. (1994):
Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF α requires transcriptional arrest
J. Immunol. **153**, 1778-1788
- Leist M., Gantner F., Böhlinger I., Tiegs G., Germann P.G., Wendel A. (1995a):
Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models
Am. J. Pathol. **146**, 1220-1234
- Leist M., Gantner F., Jilg S., Wendel A. (1995b):
Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release
J. Immunol. **154**, 1307-1316
- Leist M., Gantner F., Künstle G., Böhlinger I., Tiegs G., Bluethmann H., Wendel A. (1996):
The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure
Mol. Med. **2**, 109-124
- Lens S.M.A., Tesselaar K., Den Drijver B.F.A., Van Oers M.H.J., Van Lier R.A.W. (1996):
A dual role for both CD40-ligand and TNF α in controlling human B cell death
J. Immunol. **156**, 507-514
- Lesch R., Keppler D., Reutter W., Rudiger J., Oehlert W., Decker K. (1970):
Entwicklung einer experimentellen Leberzirrhose durch D-Galaktosamin
Virchows Arch., Abt. Zellpathol. **6**, 57-71
- Libert C., Van Bladel S., Brouckaert P., Fiers W. (1991):
The influence of modulating substances on tumor necrosis factor and interleukin-6 levels after injection of murine tumor necrosis factor or lipopolysaccharide in mice
J. Immunother. **10**, 227-235
- Libert C., Brouckaert P., Fiers W. (1994):
Protection by α_1 -acid glycoprotein against tumor necrosis factor-induced lethality
J. Exp. Med. **180**, 1571-1575
- Liehr H., Grün M., Brunswig D. (1976):
Endotoxemia in acute hepatic failure
Acta Hepato-Gastroenterol. **23**, 235-240
- Lin T., Matsuzaki G., Kenai H., Nakamura T., Nomoto K. (1993):
Thymus influences the development of extrathymically derived intestinal intraepithelial lymphocytes
Eur. J. Immunol. **23**, 1968-1974
- Liu Y.-J., Zhang J., Lane P.J.L., Chan E.Y.-T., MacLennan I.C.M. (1991):
Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens
Eur. J. Immunol. **21**, 2951-2962
- Lopez A.F., Burns G.F., Stanley I.J. (1984):
Epitope diversity of monoclonal antibodies revealed by cross-species reactivity
Mol. Immunol. **21**, 371-374
- Lührmann A., Thölke J., Behn I., Schumann J., Tiegs G., Hauschildt S. (1998):
Immunomodulating properties of antibiotic Novobiocin in human monocytes
Antimicrob. Agents Chemother. **42**, 1911-1916

- Luster M.I., Germolec D.R., Yoshida T., Kayama F., Thompson M. (1994):
Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver
Hepatology. **19**, 480-488
- Männel D.N., Moore R.N., Mergenhagen S.E. (1980):
Macrophages as a source of tumoricidal activity (Tumor-Necrotizing Factor)
Infect. Immun. **30**, 523-530
- Mathison J.C., Ulevitch R.J. (1979):
The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits
J. Immunol. **123**, 2133-2143
- Mathison J.C., Tobias P.S., Wolfson E., Ulevitch R.J. (1992):
Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein, a key component in macrophage recognition of gram-negative LPS
J. Immunol. **149**, 200-206
- Matsumoto Y. (1985):
Simultaneous inhibition of endogenous avidin-binding activity and peroxidase applicable for the avidin-biotin system using monoclonal antibodies
Histochem. **83**, 325-330
- McCuskey R.S., McCuskey P.A., Urbaschek R., Urbaschek B. (1984):
Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity
Infect. Immun. **45**, 278-280
- McConkey D.J., Chandra J., Wright S., Plunkett W., McDonnell T.J., Reed J.C., Keating M. (1996):
Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of Bcl-2 and BAX
J. Immunol. **156**, 2624-2630
- McKnight A.J., Gordon S. (1996):
EGF-TM7: a novel subfamily of seven-transmembrane-region leukocyte cell-surface molecules
Immunol. Today **17**, 283
- McKnight A.J. et Gordon S. (1998):
The EGF-TM7 family: unusual structures at the leukocyte surface
J. Leuk. Biol. **63**, 271-280
- Meagher L.C., Cousin J.M., Seckl J.S., Haslett C. (1996):
Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes
J. Immunol. **156**, 4422-4428
- Medline A., Schaffner F., Popper H. (1970):
Ultrastructural features in galactosamine-induced hepatitis
Exp. Mol. Pathol. **12**, 201-211
- Mertsching E., Grawunder U., Meyer V., Rolink T., Ceredig R. (1996):
Phenotypic and functional analysis of B lymphopoiesis in Interleukin-7-transgenic mice: expansion of pro/pre-B cell number and persistence of B lymphocyte development in lymph nodes and spleen
Eur. J. Immunol. **26**, 28-33
- Micksche M., Kokoschka E.M., Kokron O., Sagaster P., Bicker U. (1977):
Immunostimulation in cancer patients by a new synthetic compound: BM 06 002
Österr. Zeitschr. Onkol. **4**, 29-32

- Micksche M., Kokoschka E.M., Sagaster P., Bicker U. (1978a):
Phase I Study for a new immunostimulating drug, BM 06 002, in man
In: Chirigos M.A.(ed.): Immune Modulation and Control of Neoplasia by Adjuvant Therapy,
Raven Press, New York, 403-413
- Micksche M., Kokoschka E.M., Sagaster P., Bicker U. (1978b):
Clinical and immunological investigations of a new immune stimulating drug BM 06 002
(Imexon)
In: Rainer H. (ed.): Immunotherapy of malignant diseases, Schattauer, Stuttgart, 177-182
- Micksche M., Kokoschka E.M., Sagaster P., Bicker U. (1978c):
Phase I and II Study of BM 06 002, a new immunostimulating compound for cancer patients
In: Siegenthaler W. et Luethy R. (eds.): Current chemotherapy, Proc. of the 10th Intern.
Congr. of Chemother., Vol II -Zürich 1977, Am. Soc. Microbiol., Washington DC, 1110-1112
- Micksche M., Colot M., Kokoschka E.M., Sagaster P., Bicker U., Müller L. (1980):
Immune modulation by 2-cyanaziridine analogs-studies in animals and man
Int. J. Immunopharm. **2**, 202-203
- Micksche M., Colot M., Uchida A., Kokoschka E.M., Luger T.A., Dittrich C., Moser K., Rainer H.,
Lenzhofer R., Kolb R., Jakez R., Schemper M., Kokorn O., Zwick H., Scheiner A.,
Flicker H., Sagaster P. (1985):
Immunomodulation in cancer patients by synthetic biological response modifiers
Cancer Treat. Symp. **1**, 27-35
- Mita A., Ohta H., Mita T. (1982):
Induction of splenic T cell proliferation by lipid A in mice immunized with sheep red blood
cells
J. Immunol. **128**, 1709-1711
- Mizobe K., Kishihara K., Ezz-Din El-Naggar R., Madkour G.A., Kubo C., Nomoto K. (1997):
Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of
granulocytes and macrophages to an inflammatory locus
J. Neuroimmunol. **73**, 81-89
- Monroe J.G., Havran W.L., Cambier J.C. (1983):
B lymphocyte activation: entry into cell cycle is accompanied by decreased expression of IgD
but not IgM
Eur. J. Immunol. **13**, 208-213
- Mor F., Cohen I.R. (1996):
Il-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis
J. Immunol. **156**, 515-522
- Morrey J.D., Warren R.P., Okleberry K.M., Burger R.A., Johnston M.I., Sidwell R.W. (1990):
A mouse genetics model for evaluation of biological response modifiers for the treatment of
retroviral infection
J. Cell. Biochem. **68**, Part D, 68/ CM 317
- Morrey J.D., Warren R.P., Okleberry K.M., Burger R.A., Chirigos M.A.,
Sidwell R.W. (1991):
Effect of imexon treatment on Friend virus complex infection using genetically defined mice
as model for HIV-1 infection
Antiviral Res. **15**, 51-66
- Morrey J.D., Mead J.R., Warren R.P., Okleberry K.M., Burger R.A., Sidwell R.W. (1992):
Elucidation of the mode of retroviral-inhibitory effects of imexon through use of immune
competent and severe combined immune deficiency (SCID) mice
Antiviral Res. **17**, 223-233

- Morrison D.C., Ulevitch R.J. (1979):
The effects of bacterial endotoxins on host mediations systems, a review
Am. J. Pathol. **93**, 525-617
- Moser M., De Smedt T., Sornasse T., Tielemans F., Chentoufi A.A., Muraille E., Van Mechelen M., Urbain J., Leo O. (1995):
Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo
Eur. J. Immunol. **25**, 2818-2824
- Müschen M., Warskulat U., Douillard P., Gilbert E., Häusslinger D. (1998):
Regulation of CD95 (APO/FAS) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells
Hepatol. **27**, 200-208
- Munford R.S., Hall C.L. (1984):
Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by human neutrophil enzyme
Science **234**, 203-205
- Nagata S. (1997):
Apoptosis by death factor
Cell **88**, 355-365
- Naitoh Y., Fukata J., Tomigana T., Nakai Y., Tamai S., Mori K., Imura H. (1988):
Interleukin 6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats
Biochem. Biophysic. Res. Commun. **155**, 1459-1463
- Nakayama E., Shiku H., Stockert E., Oettgen H.F., Old L.J. (1979):
Cytotoxic T cells: Lyt phenotype and blocking of killing activity by Lyt antisera
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 1977-1981
- Nakayama K.-I., Nakayama K., Neglishi I., Kuida K., Louie M.C., Kanagawa O., Nakauchi H., Loh D.Y. (1994):
Requirement for CD8 β chain in positive selection of CD8-lineage T cells
Science **263**, 1131-1133
- Nicholson D.W., Thornberry N.A. (1997):
Caspases: killer proteases
TIBS **22**, 299-306
- Norimatsu M., Ono T., Aoki A., Ohishi K., Tamura Y. (1995):
In vivo induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolysaccharides
J. Med. Microbiol. **43**, 251-257
- Norment A.M., Salter R.D., Parham P., Engelhard V.H., Littman D.R. (1988):
Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules
Nature **336**, 79-81
- Nussenzweig M.C., Steinmann R.M., Unkeless J.C., Witmer M.D., Gutchinov B., Cohn Z.A. (1981):
Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes
J. Exp. Med. **154**, 168-187
- Oberhammer F., Bursch W., Tiefenbacher R., Fröschl G., Pavelka M., Purchio T., Schulte-Hermann R. (1993):
Apoptosis is induced by transforming growth factor β 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA
Hepatol. **18**, 1238-1246

- Okusawa S., Gelfand J.A., Ikejima T., Connolly R.J., Dinarello C.A. (1988):
Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits, synergismus with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition
J. Clin. Invest. **81**, 1162-1172
- Old L.J. (1985):
Tumor Necrosis Factor (TNF)
Science **230**, 630-632
- Onel K.B., Tucek-Szabo c.L., Ashany D., Lacy E., Nikolic-Zugic J., Elkon K.B. (1995):
Expression and function of murine CD95/ FasR/ APO-1 receptor in relation to B cell ontogeny
Eur. J. Immunol. **25**, 2940-2947
- Pai R., Bassa B., Kirschenbaum M.A., Kamanna V.S. (1996):
TNF- α stimulates monocyte adhesion to glomerular mesangial cells
J. Immunol. **156**, 2571-2579
- Parry S.L., Hasbold J., Holman M., Klaus G.G.B. (1994):
Hypercross-linking surface IgM or IgD receptors on mature B cells induce apoptosis that is reversed by costimulation with IL-4 and Anti-CD40:
J. Immunol. **152**, 2821-2829
- Persidsky Y., Steffan A.-M., Gendrault J.-L., Hurtel B., Berger S., Royer C., Stutte H.-J., Muchmore E., Aubertin A.-M., Kim A. (1995):
Permissiveness of Kupffer cells for simian immunodeficiency virus (SIV) and morphological changes in the liver of rhesus monkeys at different periods of SIV infection
Hepatology **21**, 1215-1225
- Persson U. (1977):
Lipopolysaccharide-induced suppression of the primary immune response to a thymus dependent antigen
J. Immunol. **118**, 789-796
- Pezeshki G., Pohl T., Schöbitz B. (1996):
Corticosterone controls interleukin-1 β expression and sickness behaviour in the rat
J. Neuroendocrinol. **8**, 129-135
- Pfeffer K., Matsuyama T., Kündig T.M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P.S., Krönke M., Mak T.W. (1993):
Mice deficient for the 55kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L.monocytogenes* infection
Cell **73**, 457-467
- Portnoi D., Motta I., Truffa-Bachi P. (1981):
Immune unresponsiveness of spleen cells from lipopolysaccharide-treated mice to particulate thymus-dependent antigen
I. evidence for differentiation signal defect
Eur. J. Immunol. **11**, 156-158
- Raetz C.R.H., Ulevitch R.J., Wright S.D., Silbley C.H., Ding A., Nathan C.F. (1991):
Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction
FASEB J. **5**, 2652-2660
- Raff M.C., Wortis H.H. (1970):
Thymus dependence of q-bearing cells in the peripheral lymphoid tissues in mice
Immunol. **18**, 931-942

- Ralph P., Ho M.-K., Litofsky P.B., Springer T.A. (1983):
Expression and induction in vitro of macrophage differentiation antigens on murine cell line
J. Immunol. **130**, 108-114
- Ray A., LaForge K.S., Sehgal P.B. (1990):
On the mechanism for efficient repression of the Interleukin-6 promotor by glucocorticoids:
Enhancer, TATA Box and RNA Start Site (Inr Motif) Occlusion
Mol. Cell. Biol. **10**, 5736-5746
- Remick D.G., Strieter R.M., Lynch III J.P., Dung Ngyen D., Eskandari M., Kunkel S.L. (1989):
In vivo dynamics of murine tumor necrosis factor- α gene expression, kinetics of
dexamethasone-induced suppression
Lab. Invest. **60**, 766-771
- Remick D.G., Strieter R.M., Ekanari M.K., Nguyen D.T., Genord M.A., Raiford C.L., Kunkel S.L. (1990):
Role of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations
Am. J. Pathol. **136**, 49-60
- Reutter W., Lesch R., Keppler D., Decker K. (1968):
Galactosamin-Hepatitis
Naturwissenschaften **55**, 497
- Rivier C., Chizzonite R., Vale W. (1989):
In the mouse, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by lipopolysaccharide
(endotoxin) is mediated through Interleukin-1
Endocrinol. **125**, 2800-2805
- Rocha B., Vassalli P., Guy-Grand D. (1992):
The extrathymic T-cell development pathway
Immunol. Today **13**, 449-454
- Roitt I.M. (1993):
Die erworbene Immunantwort, Folgen der Antigenerkennung
In: Zink C. (ed.): Leitfaden der Immunologie, Blackwell Wissenschafts-Verlag,
Berlin, 106-130
- Rutherford M.S., Witsell A., Schook L.B. (1993):
Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages:
chaos revisited
J. Leuk. Biol. **53**, 602-618
- Sabbele N.R., Van Oudenaren A., Hooijkaas H., Brenner R. (1987):
The effect of corticosteroids upon murine B cells in vivo and in vitro as determined in the
LPS-culture system
Immunol. **62**, 285-290
- Salkowski C.A., Neta R., Weyn T.A., Strassmann G., Van Rooijen N., Vogel S.N. (1995):
Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS-induced cytokine gene expression
and radioprotection
J. Immunol. **155**, 3168-3179
- Salmon S.E., Fanta P., Kottmann A., Hersch E.M. (1993):
Imexon exhibits selective in vitro antitumor activity against
human multiple myeloma
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **34**, 374

- Salomao R., Rigato O., Pignatari A.C., Freudenberg M.A., Galanos C. (1999):
Bloodstream infections: epidemiology, pathophysiology and
therapeutic perspectives
Infection **27**, 1/5-10/14
- Samson J.N., Langermans J.A.M., Savelkoul H.F.J., Van Furth R. (1995):
Tumor necrosis factor, but not interferon- γ , is essential for acquired resistance to *Listeria*
monocytogenes during a secondary infection in mice
Immunol. **86**, 256-262
- Sanghera J.S., Weinstein S.L., Aluwalia M., Girn J., Pelech S.L. (1996):
Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine
macrophages
J. Immunol. **156**, 4457-4465
- Sauer A., Hartung T., Aigner J., Wendel A. (1996):
Endotoxin-inducible granulocyte-mediated hepatotoxicity requires adhesion and serine
protease release
J. Leuk. Biol. **60**, 3-11
- Scheuer W., Rußmann E. (1989):
Unveröffentlichte Firmendokumentation, Boehringer Mannheim GmbH
- Schiessel C., Forsthove C., Keppler D. (1984):
Calcium uptake during the transition from reversible to irreversible liver injury induced by
D-Galactosamine in vivo
Hepatology **4**, 855-861
- Schlayer H.-J., Karc U., Gantner U., Hermann R., Decker K. (1987):
Enhancement of neutrophil adherence to isolated rat liver sinusoidal endothelial cells by
supernatants of lipopolysaccharide-activated monocytes
J. Hepatology **5**, 311-321
- Schlayer H.-J., Laaf H., Peters T., Schaefer H.E., Decker K. (1989):
Tumor necrosis factor (TNF) mediates lipopolysaccharide (LPS) elicited neutrophil sticking to
sinusoidal endothelial cells in vivo
In: Wisse E., Knook D.L. et Decker K. (eds.): *Cells of the Hepatic Sinusoid, Kupffer Cell*
Foundation, Rijswijk, The Netherlands, 319-324
- Schlayer H.-J., Laaf H., Peters T., Woort-Menker M., Estler H.C., Karc U., Schaefer H.E., Decker K. (1988):
Involvement of tumor necrosis factor in endotoxin-triggered neutrophil adherence to
sinusoidal endothelial cells of mouse liver and its modulation in acute phase
J. Hepatology **7**, 239-249
- Schöbitz B., Van den Dobbelsteen M., Holsboer F., Sutano W., De Kloet E.R. (1992):
Regulation of Interleukin 6 gene expression in the rat
Endocrinol. **132**, 1569-1576
- Schulze-Osthoff K., Bakkers A.C., Vanhaesebroeck B., Beyaert R., Jacobs W.A., Fiers W. (1992):
Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial
functions
J. Biol. Chem. **267**, 5317-5323
- Scott D.W., Grdina T., Shi Y. (1996):
T cells commit suicide, but B cells are murdered
J. Immunol. **156**, 2352-2356

- Senaldi G., Shaklee C.L., Simon B., Rowan C.G., Lacey D.L., Hartung T. (1998):
Keratinocyte growth factor protects murine hepatocytes from tumor necrosis factor-induced apoptosis in vivo and in vitro
Hepatology. **27**, 1584-1591
- Sharp B.M., Matta S.G., Peterson P.K., Newton R., Chao C., McAllen K. (1989):
Tumor necrosis factor- α is a potent ACTH secretagogue: comparison to Interleukin 1 β
Endocrinology. **124**, 3131-3133
- Shinozuka H., Faber J.L., Konishi Y., Anukarahanonta T. (1973):
D-Galactosamine and acute liver cell injury
Fed. Proc. **32**, 1516-1526
- Shiratori Y., Kawase T., Shiina S., Okano K., Sugimoto T., Teraoka H., Matano S., Matsumoto K., Kamii K. (1988):
Modulation of hepatotoxicity by macrophages in the liver
Hepatology. **4**, 815-821
- Shiratori Y., Tanaka M., Hai K., Kawase T., Shiina S., Sugimoto T. (1990a):
Role of endotoxin-responsive macrophages in hepatic injury
Hepatology. **11**, 183-192
- Shiratori Y., Tanaka M., Umihara J., Kawase T., Shiina S., Sugimoto T. (1990b):
Leukotriene inhibitors modulate hepatic injury induced by lipopolysaccharide-activated macrophages
J. Hepatology. **10**, 51-61
- Shiratori Y., Hai K., Takada H., Kiriya H., Nagura T., Matsumoto K., Kamii K., Okano K., Tanaka M. (1992):
Mechanism of accumulation of macrophages in Galactosamine-induced liver injury: effect of lipoxygenase inhibitors on chemotaxis of spleen cells
Pathobiology. **60**, 316-321
- Shiratori Y., Kawase T., Komatsu Y., Hikiba Y., Okano K., Kamii K., Omata M. (1995):
Endotoxin induced cellular communication in the liver: Murine models for clarification of the role of LPS-responsive macrophages in the pathogenesis of liver diseases
J. Gastroenterology and Hepatology. **10**, 97-100
- Sidwell R.W., Morrey J.D., Okleberry K., Warren R.P., Burger R., Johnson M.I. (1990):
A comparison of immunomodulator effects on infections induced by the Friend Retrovirus Complex in genetically defined mice
Antiviral Research. **93** Suppl.1, 103
- Smith K.G.C., Hewitson T.D., Nossal G.J.V., Tarlinton D.M. (1996):
The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci
Eur. J. Immunology. **26**, 444-448
- Snapper C.M., Yamada H., Smoot D., Sneed R., Lees A., Mond J.J. (1993):
Comparative in vitro analysis of proliferation, Ig secretion, and Ig class switching by murine marginal zone and follicular B cells
J. Immunology. **150**, 2737-2745
- Solorzano C.C., Ksontini R., Pruitt J.H., Hess P.J., Edwards P.D., Kaibara A., Abouhamze A., Aufferberg T., Galardy R.E., Vauthey J.N., Copeland III E.M., Edwards III C.K., Lauwers G.Y., Clare-Salzler M., MacKay S.L.D., Moldawer L.L., Lazarus D.D. (1997):
Involvement of 26-kDa cell-associated TNF- α in experimental hepatitis and exacerbation of liver injury with a matrix metalloproteinase inhibitor
J. Immunology. **158**, 414-419

- Springer T., Galfre G., Secher D.S., Milstein C. (1978):
 Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens
 Eur. J. Immunol. **8**, 539-551
- Springer T., Galfre G., Secher D.S., Milstein C. (1979):
 MAC-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody
 Eur. J. Immunol. **9**, 301-306
- Springer T.A. (1981):
 Monoclonal antibody analysis of complex biological systems
 J. Biol. Chem. **256**, 3833-3839
- Springer T.A., Thompson W.S., Miller L.J., Schmalstieg F.C., Anderson D.C. (1984):
 Inherited deficiency of MAC-1, LFA-1, p150, 95 glycoprotein family and its molecular basis
 J. Exp. Med. **160**, 1901-1918
- Springer T.A., Anderson D.C. (1986):
 Leukocyte complement receptors and adhesion proteins in the inflammatory response: insights from an experiment of nature
 Biochem. Soc. Symp. **51**, 47-57
- Stacey M., Lin H.-H., Hilyaro K.L., Gordon S., McKnight A.J. (2001):
 Human epidermal growth factor (EGF) module-containing mucin-like hormone receptor 3 is a new member of the EGF-TM7 family that recognizes a ligand on human macrophages and activated neutrophils
 J.Biol.Chem. **276**, 18863-18870
- Stachlewitz R.F., Seabra V., Bradford B., Bradham C.A., Rusyn I., Germolec D., Thurman R.G. (1999):
 Glycine and uridine prevent D-Galactosamine hepatotoxicity in rat: role of Kupffer cells
 Hepatol. **29**, 737-745
- Starnes H.F., Warren R.S., Jeevanandam M., Gabrilove J.L., Larchain W., Oettgen H.F., Brennan M.F. (1988):
 Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man
 J. Clin. Invest. **82**, 1321-1325
- Steger B. (1993):
 Untersuchungen des Einflusses von Imexon auf die humorale Immunantwort in einem In-Vitro-Modell und in zwei In-Vivo-Modellen
 Med. vet. Dissertation Univ. Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin
- Steger B., Hartig F., Dietmann G., Herrmann D., Deschl U., Rebel W. (1993):
 Improvement of course of disease in MRL lpr/lpr mice by selective B cell depletion following imexon therapy
 Association of Veterinary Teachers and Research Workers
 Scarborough Meeting 1993
 Scientific Programme, Abstract of Papers and List of Authors, 2 C 20, 40
- Stout R.D., Suttles J. (1992):
 Evidence for involvement of TNF α in the induction phase and IFN β in the effector phase of antiproliferative activity of splenic macrophages
 Cell. Immunol. **139**, 363-374
- Strasser B. (1986a):
 Mikroskopische Anatomie
 In: Haschneider A.M. (ed.): Die Milz, Hippokrates Verlag, Heidelberg, 23-29
- Strasser B. (1986b):
 Hämatologische Funktionen
 In: Haschneider A.M. (ed.): Die Milz, Hippokrates Verlag, Heidelberg, 30-37

- Sun D., Lohmann-Matthes M.-L. (1982):
Functionally different subpopulations of mouse macrophages recognized by monoclonal antibodies
Eur. J. Immunol. **12**, 134-140
- Sunderkötter C., Beil W., Roth J., Sorg C. (1991):
Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea
Am. J. Pathol. **138**, 931-939
- Suzuki S., Nakamura S., Serizawa A., Sakaguchi T., Konno H., Muro H., Kosugi I., Baba S. (1996):
Role of Kupffer cells and the spleen in the modulation of endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy
Hepatology **24**, 219-225
- Snyder D.S., Unanue E.R. (1982):
Communications, Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and Interleukin 1 production
J. Immunol. **129**, 1803-1805
- Takenaka K., Sakaida I., Yasunaga M., Okita K. (1998):
Ultrastructural study of development of hepatic necrosis induced by TNF and Galactosamine
Dig. Dis. Sci. **43**, 887-892
- Tiegs G., Wendel A. (1988):
Leukotriene-mediated liver injury
Biochem. Pharmacol. **37**, 2569-2573
- Tiegs G., Wolter M., Wendel A. (1989):
Tumor necrosis factor is a terminal mediator in Galactosamine/Endotoxin-induced hepatitis in mice
Biochem. Pharmacol. **38**, 627-631
- Tonks N.K., Diltz C.D., Fischer E.H. (1990):
CD45, an integral membrane protein tyrosine phosphatase
J. Biol. Chem. **265**, 10674-10680
- Tracey K.J., Beutler B., Lowry S.F., Merryweather J., Wolf S., Milsark I.W., Hariri R.J., Fahey III T.J., Zentella A., Albert J.D., Shires G.T., Cerami A. (1986):
Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin
Science **234**, 470-474
- Trowbridge I.S. (1991):
CD45, a prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases
J. Biol. Chem. **266**, 23517-23520
- Tsutsui S., Hirasawa K., Takeda M., Itagaki S.-I., Kawamura S., Maeda K., Mikami T., Doi K. (1997):
Galactosamine-induced apoptosis in primary mouse hepatocyte cultures
Exp. Toxic Pathol. **49**, 301-306
- Ulich T.R., Guo K., Irwin B., Remick D.G., Davatelis G.N. (1990):
Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo
II. Regulation of tumor necrosis factor and Interleukin-1 α/β expression and suppression
Am. J. Pathol. **137**, 1173-1185
- Ulich T.R., Kaizhi G., Remick D., del Castillo J., Yin S. (1991):
Endotoxine-induced cytokine gene expression in vivo
J. Immunol. **146**, 2316-2323

- Unanue E.R. (1984):
Antigen-presenting function of the macrophage
Ann. Rev. Immunol. **2**, 395-428
- Van Ewijk W., Nieuwenhuis P. (1985):
Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp
Experientia **41**, 199-208
- Van Rooijen N., Van Nieuwmegen R., Kamperdijk E.W.A. (1985):
Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphate
Virchows Arch. **49**, 375-383
- Van Rooijen N., Kors N., Kraal G. (1989a):
Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetic after liposome-mediated elimination
J. Leuk. Biol. **45**, 97-104
- Van Rooijen N., Claassen E., Kraal G., Dijkstra C.D. (1989b):
Cell populations involved in the splenic immune reactions
In: Immune functions of the spleen, immunocytochemical characterization of lymphoid and non-lymphoid cells involved in the "In Situ" immune response, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 10-21
- Van Rooijen N., Claassen E., Kraal G., Dijkstra C.D. (1989c):
Lymphocyte migration and recirculation in the spleen
In: Immune functions of the spleen, immunocytochemical characterization of lymphoid and non-lymphoid cells involved in the "In Situ" immune response, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 21-24
- Van Vliet E., Melis M., Van Ewijk W. (1985):
Marginal zone macrophages in the mouse spleen identified by a monoclonal antibody
J. Histochem. Cytochem. **33**, 40-44
- Vogel S.N., Hilfiker M.L., Caulfield M.J. (1983):
Endotoxin-induced T lymphocyte proliferation
J. Immunol. **130**, 1774-1779
- Von Ardenne M. (1975):
Nachweis krebshemmender Eigenschaften einer stark immunstimulierenden Verbindung kleiner Molekülmasse
Arzneim.-Forsch. **25**, 1369-1379
- Waage A. (1987):
Production and clearance of tumor necrosis factor in rats exposed to endotoxin and dexamethasone
Clin. Immunol. Immunopathol. **45**, 348-355
- Waage A., Bakke O. (1988):
Glucocorticoids suppress the production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes
Immunol. **63**, 299-302
- Waage A., Slupphaug G., Shalaby R. (1990):
Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts
Eur. J. Immunol. **20**, 2439-2443

- Walker P.R., Testolin L., Armato U., Marceau N., Gourdeau H., Sikorska M. (1995):
Modulation of apoptosis by oncogenes
In: Tenniswood M. et Michna H. (eds.): Apoptosis in hormone-dependent cancers,
Ernst Schering Research Foundation Workshop 14, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 103-119
- Wang J., Wendel A. (1990):
Studies of the hepatotoxicity of Galactosamine/Endotoxin or Galactosamine/TNF in the
perfused mouse liver
Biochem. Pharmacol. **39**, 267-270
- Wang J.H., Redmond H.P., Wu Q.D., Bouchier-Hayes D. (1998):
Nitric oxide mediates hepatocyte injury
Am. J. Physiol. **275**, G1117-1126
- Warschkau H., Kiderlen A.F. (1999):
A monoclonal antibody directed against murine macrophage surface molecule F4/80
modulates natural immune response to *Listeria monocytogenes*
J. Immunol. **163**, 3409-3416
- Weinstein S.L., Gold M.R., DeFranco A.L. (1991):
Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 4148-4152
- Weinstein S.L., June C.H., DeFranco A.L. (1993):
Lipopolysaccharide-induced protein tyrosine phosphorylation in human macrophages is
mediated by CD14
J. Immunol. **151**, 3829-3838
- Weiss A., Littman D.R. (1994):
Signal transduction by lymphocyte antigen receptors
Cell **76**, 263-274
- Wendel A., Tiegs G., Werner C. (1987):
Evidence for the involvement of a reperfusion injury in Galactosamine/Endotoxin-induced
hepatitis in mice
Biochem. Pharmacol. **36**, 2637-2639
- Wendel A. (1990):
Biochemical pharmacology of inflammatory liver injury in mice
Methods Enzymol. **186**, 675-680
- Wheeler C.J., Von Hoegen P., Parnes J.R. (1992):
An immunological role for the CD8 β -chain
Nature **357**, 247-249
- Wilson M.E. (1985):
Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function
Rev. Infect. Dis. **7**, 404-418
- Winchurch R.A., Hilberg C., Birmingham W., Munster A.M. (1982):
Inhibition of graft rejection by LPS: further evidence for effects on T lymphocytes
J. Reticuloendothel. Soc. **31**, 31-42
- Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. (1990):
CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein
Science **249**, 1429-1431

- Xiong Q., Hase K., Tezuka Y., Namba T., Kadota S. (1999):
Acetoside inhibits apoptosis in D-Galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury
Life Sci. **65**, 421-430
- Xu H., Gonzalo J.A., St. Pierre Y., Williams I.R., Kupper T.S., Cotran R.S., Springer T.A.,
Gutierrez-Ramos J.-C. (1994):
Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice
J. Exp. Med. **180**, 95-109
- Yamakawa T., Tanaka S.-I., Yamakawa Y., Isoda F., Kawamoto S., Fukushima J., Minami M., Okuda K.,
Sekihara H. (1996):
Genetic control of in vivo tumor necrosis factor production in mice
Clin. Immunol. Immunopathol. **79**, 256-262
- Yamamoto M., Fukuda K., Miura N., Suzuki R., Kido T., Komatsu Y. (1998):
Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor β 1-induced apoptosis in rat
hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction
Hepatol. **27**, 959-966
- Yokochi T., Fuji Y., Inoue Y., Ito H., Kimura Y., Kato N. (1990):
Differential response of B cells in the lymph node and the spleen to bacterial
lipopolysaccharide
Cell. Immunol. **128**, 79-88
- Yokochi T., Kato Y., Sugiyama T., Koide N., Morikawa A., Jiang G.-Z., Kawai M., Yoshida T., Fukada M.,
Takahashi K. (1996):
Lipopolysaccharide induces apoptotic cell death of B-memory-cells and regulates B-cell
memory in antigen-nonspecific manner
FEMS Immunol. Med. Microbiol. **15**, 1-8
- Zacharchuk C.M., Mercep M., Chakraborti P.K., Simons S.S., Ashwell J.D. (1990):
Programmed T-lymphocyte death, cell activation- and steroid-induced pathways are mutually
antagonistic
J. Immunol. **145**, 4037-4045
- Zarewych D.M., Kindzelskii A.L., Todd III R.F., Petty H.R. (1996):
LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by
neutrophil adhesion
J. Immunol. **156**, 430-433
- Zeng L., Fisher G., Miller R.E., Peschon J., Lynch D.H., Lenardo M.J. (1995):
Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor
Nature **377**, 348-351
- Zhou T., Edwards III C.K., Yang P., Wang Z., Bluethmann H., Mountz J.D. (1996):
Greatly accelerated lymphadenopathy and autoimmune disease in lpr mice lacking tumor
necrosis factor receptor 1
J. Immunol. **156**, 2661-2665
- Ziegler A.E., Bicker U., Hebold G. (1977):
Experimental investigations on increased resistance to infections with *Candida albicans* and
Staphylococcus aureus Smith by 4-imino-1,4-diazobicyclo-(3.1.0)-hexane-2-on BM 06 002
(Prop. INN Imexon) in mice
Exp. Path. **14**, 321-327
- Zuckerman S.H., Bendele A.M. (1989):
Regulation of serum tumor necrosis factor in glucocorticoid-sensitive and -resistant rodent
endotoxin shock models
Infect. Immun. **57**, 3009-3013

- Zuckerman S.H., Shellhaas J., Butler L.D. (1989):
Differential regulation of lipopolysaccharide-induced Interleukin 1 and tumor necrosis factor
synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-
adrenal axis
Eur. J. Immunol. **19**, 301-305
- Zuckerman S.H., Evans G.F., Butler L.D. (1991):
Endotoxin tolerance: independent regulation of Interleukin-1 and tumor necrosis factor
expression
Infect. Immun. **59**, 2773-2780

9 Anhang

9.1 Reagenzien

9.1.1 Durchflußzytometrie

9.1.1.1 FACS/PBS

PBS (vgl. Kap. 9.1.3.1) mit 0,1 % Natriumazid (Fa. Merck, Darmstadt) und 2 % FKS hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min (Fa. Boehringer Mannheim) mischen.

9.1.2 Klassische Histologie (H.E.-Färbung)

9.1.2.1 Häkalaun (nach Mayer)

1 g Hämatoxylin (Fa. Merck, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. lösen
0,2 g Natriumiodat (Fa. Merck, Darmstadt) und 50 g Kaliumaluminiumsulfat (Fa. Merck, Darmstadt) unter kräftigem Schütteln zugeben, bis die Lösung eine blauviolette Farbe annimmt.
50 g Chloralhydrat (Fa. Merck, Darmstadt) und 1 g Zitronensäure (Fa. Merck, Darmstadt) zugeben (Farbumschlag rotviolett).

9.1.2.2 Eosin

10 g Eosin (Fa. Merck, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. lösen,
vor der Färbung wenige Tropfen Eisessig in die Lösung geben, um
die Zytoplasmafärbung zu verstärken.
Die Stammlösung ist 1 Jahr haltbar.
Die Gebrauchslösung verfällt nach ca. 14 Tagen.

9.1.3 Immunhistologie

9.1.3.1 PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4 0,01 M

Stammlösungen:

Lösung A:	1,36 g/l	KH_2PO_4
Lösung B:	1,78 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times (2\text{H}_2\text{O})$

Gebrauchslösung:

200 ml Lösung A + 800 ml Lösung B + 8,77 g/l NaCl

9.1.3.2 Tris-Puffer pH 7,65

Stammlösung:

60,57 g Tris in 610 ml Aqua dest. mit 1 N HCl auf pH 7,65 einstellen und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua dest.

9.1.4 TUNEL-Test

9.1.4.1 Tris-Puffer pH 7,5

6,057 g Tris
1000 ml Aqua dest. mit 32 %iger HCl auf pH 7,5 einstellen.

9.2 Tabellen (Einzelwerte)

9.2.1 Serologische Befunde

9.1.1.1 TNFa-Serumspiegel (2 h -Werte, 7 h-Gruppen)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	TNFa [pg/ ml]
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	unter der Nachweisgrenze
	2	unter der Nachweisgrenze
	3	unter der Nachweisgrenze
$\bar{x}$		-
s		-
SEM		-
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	960
	5	615
	6	2057
	7	1335
	8	1155
	9	846
$\bar{x}$		1161,33
s		504,16
SEM		205,82
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	2849
	11	857
	12	1894
	13	1237
	14	988
	15	1906
$\bar{x}$		1621,83
s		747,74
SEM		305,26
Dexamethason- Gruppe 7 h (n=6)	16	323
	17	218
	18	375
	19	388
	20	226
	21	199
$\bar{x}$		288,17
s		84,21
SEM		34,38

9.2.1.2 TNFa -Serumspiegel (2 h -Werte, 24 h -Gruppen)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	TNFa [pg/ ml]
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	unter der Nachweisgrenze
	23	unter der Nachweisgrenze
	24	unter der Nachweisgrenze
$\bar{x}$		-
s		-
SEM		-
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	1074
	26	1031
	27	1315
	28	509
	29	1080
	30	753
	31	1109
	32	1474
	33	1017
	34	2657
$\bar{x}$		1201,9
s		576,29
SEM		182,24
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	13061
	36	1442
	37	949
	38	1277
	39	1198
	40	579
	41	1155
	42	3453
	43	1114
	44	2700
$\bar{x}$		2692,8
s		3745,33
SEM		1184,38
Dexamethason- Gruppe 24 h (n=10)	45	146
	46	340
	47	175
	48	u.Nwg
	49	224
	50	277
	51	269
	52	209
	53	209
	54	290
$\bar{x}$		237,67
s		61,14
SEM		20,38

9.2.1.3 ASAT/ ALAT-Plasmaspiegel (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	ASAT [U/ l]	ALAT [U/ l]
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	123	42
	2	352	71
	3	248	135
$\bar{x}$		241	82,67
s		114,66	47,59
SEM		66,2	27,47
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	1890	2205
	5	302	197
	7	2226	3024
	8	1764	1082
	9	over limit	Over limit
$\bar{x}$		1545,5	1627
s		851,62	1241,99
SEM		425,81	621
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	1012	870
	11	577	438
	12	487	368
	13	190	68
	14	1848	1932
	15	364	252
$\bar{x}$		746,33	654,67
s		605,95	680,2
SEM		247,38	277,69
Dexamethason-Gruppe 7 h (n=6)	16	148	65
	17	126	92
	18	171	83
	19	210	126
	20	566	422
	21	126	131
$\bar{x}$		224,5	153,17
s		170,27	134,12
SEM		69,51	54,75

9.2.1.4 ASAT/ ALAT-Plasmaspiegel (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	ASAT [U/ l]	ALAT [U/ l]
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	50	30
	23	43	3
	24	47	28
$\bar{x}$		46,67	20,33
s		3,51	15,04
SEM		2,03	8,69
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	2142	4032
	27	382	508
	28	1638	4683
	30	671	899
	31	5040	5019
	32	3759	12831
	33	1386	3465
$\bar{x}$		2145,43	4491
s		1688,19	4080,47
SEM		638,08	1542,27
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	236	323
	37	299	496
	38	2814	5817
	39	5460	8337
	41	448	726
	42	563	998
	43	1722	2625
	44	568	1068
$\bar{x}$		1513,75	2548,75
s		1826,37	2958,73
SEM		645,72	1046,07
Dexamethason- Gruppe 24 h (n=10)	45	544	423
	46	1029	966
	47	192	168
	48	45	26
	49	4158	4578
	50	561	522
	51	362	296
	52	244	253
	53	110	70
	54	798	769
$\bar{x}$		804,3	807,1
s		1218,74	1358,32
SEM		385,4	429,54

9.2.2 FACS-Analyse des peripheren Blutes

9.2.2.1 Zahl der Lymphozyten und Monozyten (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-nummer	Lymphozyten		Monozyten		Leuko-zyten-zahl ¹
		Zellzahl ¹	In % der Leukozyten	Zellzahl ¹	in % der Leukozyten	
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	3225	69,30	208	4,47	4654
	2	3327	70,83	229	4,88	4697
	3	3054	64,42	263	5,55	4741
$\bar{x}$		3202,00	68,18	233,33	4,97	4697,33
s		137,95	3,35	27,75	0,55	43,50
SEM		79,64	1,93	16,02	0,31	25,12
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	1905	46,81	129	3,17	4070
	5	2367	50,88	194	4,17	4652
	7	1808	38,98	230	4,96	4638
	8	2536	54,79	255	5,51	4629
	9	1740	42,57	327	8,00	4087
$\bar{x}$		2071,20	46,81	227,00	5,16	4415,20
s		357,12	6,32	73,29	1,81	307,53
SEM		159,71	2,82	32,78	0,81	137,53
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	2435	50,75	203	4,23	4798
	11	2969	61,96	117	2,44	4792
	12	1957	41,90	239	5,12	4671
	13	2748	57,30	167	3,48	4796
	14	2399	51,27	206	4,40	4678
	15	1702	35,65	199	4,17	4774
$\bar{x}$		2368,33	49,81	188,50	3,97	4751,50
s		474,03	9,69	41,84	0,92	60,29
SEM		193,52	3,96	17,08	0,37	24,61
Dexamethason-Gruppe 7 h (n=6)	16	1291	26,70	166	3,43	4836
	17	1419	29,40	180	3,73	4827
	18	1156	23,81	230	4,74	4855
	19	1327	27,85	128	2,69	4765
	20	803	16,69	243	5,05	4810
	21	1276	27,05	304	6,44	4717
$\bar{x}$		1135,33	23,86	225,00	4,73	4764,00
s		288,94	6,23	89,37	1,90	46,51
SEM		166,82	3,59	51,60	1,09	26,85

¹ Zahl pro 5×10^3 ausgezählte Zellen

9.2.2.2 Zahl der Lymphozyten und Monozyten (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-Nummer	Lymphozyten		Monozyten		Leukozyten-zahl ¹
		Zellzahl ¹	in % der Leukozyten	Zellzahl ¹	in % der Leukozyten	
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	3561	81,81	249	5,72	4353
	23	3241	77,41	133	3,18	4187
	24	3564	80,18	271	6,10	4445
$\bar{x}$		3455,33	79,80	217,67	5,00	4328,33
s		185,62	2,22	74,14	1,59	130,76
SEM		107,17	1,28	42,81	0,92	75,49
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	2630	54,99	246	5,14	4783
	27	2899	60,79	347	7,28	4769
	28	2204	46,93	399	8,50	4696
	30	1469	40,38	179	4,92	3638
	31	3258	67,00	178	3,66	4863
	32	2917	59,91	192	3,94	4869
	33	2994	63,72	99	2,11	4699
$\bar{x}$		2624,43	56,25	234,29	5,08	4616,71
s		607,01	9,54	105,11	2,19	437,05
SEM		229,43	3,60	39,73	0,83	165,19
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	1920	42,89	231	5,16	4477
	37	2808	59,45	229	4,85	4723
	38	2138	56,70	257	6,82	3771
	39	1129	23,57	163	3,40	4790
	41	2078	54,60	268	7,04	3806
	42	2555	54,65	277	5,93	4675
	43	2795	59,34	178	3,78	4710
	44	1988	47,31	204	4,85	4202
$\bar{x}$		2176,38	49,81	225,88	5,23	4394,25
s		552,19	12,07	41,61	1,31	417,73
SEM		195,23	4,27	14,71	0,46	147,69
Dexamethason-Gruppe 24 h (n=10)	45	2562	54,07	289	6,10	4738
	46	2464	51,84	289	6,08	4753
	47	3090	64,23	269	5,59	4811
	48	3944	83,28	114	2,41	4736
	49	3249	68,21	357	7,50	4763
	50	3371	70,13	309	6,43	4807
	51	3374	70,31	328	6,83	4799
	52	3090	66,07	271	5,79	4677
	53	3229	66,05	165	3,37	4889
	54	2890	60,55	506	10,60	4773
$\bar{x}$		3126,30	65,47	289,70	6,07	4774,60
s		425,70	8,89	105,60	2,22	56,78
SEM		134,62	2,81	33,39	0,70	17,96

¹ Zahl pro 5x 10³ ausgezählte Zellen

9.2.2.3 Zahl der B- und T-Lymphozyten (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-nummer	B220 ⁺ -Zellen		CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Leukozyten	in % der Lymphozyten	in % der Leukozyten	in % der Lymphozyten
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	17,25	24,90	49,16	70,95
	2	12,89	18,20	55,04	77,70
	3	14,94	23,20	46,64	72,40
$\bar{x}$		15,03	22,10	50,28	73,68
s		2,18	3,48	4,31	3,55
SEM		1,26	2,01	2,49	2,05
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	4,15	8,87	41,69	89,08
	5	4,11	8,07	45,64	89,69
	7	6,81	17,48	31,33	80,37
	8	13,37	24,41	40,14	73,26
	9	8,10	19,02	31,07	72,99
$\bar{x}$		7,31	15,57	37,97	81,08
s		3,80	6,98	6,50	8,14
SEM		1,70	3,12	2,91	3,64
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	12,05	23,74	38,20	75,28
	11	4,18	6,74	57,29	92,46
	12	4,67	11,14	36,67	87,53
	13	10,89	19,00	45,85	80,02
	14	9,53	18,59	40,78	79,53
	15	5,55	15,57	29,56	82,90
$\bar{x}$		7,81	15,80	41,39	82,95
s		3,42	6,08	9,44	6,17
SEM		1,40	2,48	3,85	2,52
Dexamethason-Gruppe 7 h (n=6)	16	5,40	20,22	20,70	77,54
	17	1,20	4,09	27,60	93,87
	18	2,99	12,54	19,86	83,39
	19	6,40	22,98	20,69	74,30
	20	1,68	10,09	14,37	86,08
	21	3,35	12,38	22,98	84,95
$\bar{x}$		3,50	13,72	21,03	83,36
s		2,04	6,89	4,31	6,88
SEM		0,83	2,81	1,76	2,81

9.2.2.4 Zahl der B- und T-Lymphozyten (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-nummer	B220 ⁺ -Zellen		CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Leukozyten	in % der Lymphozyten	in % der Leukozyten	in % der Lymphozyten
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	30,35	37,10	48,52	59,31
	23	22,81	29,47	51,23	66,18
	24	34,40	42,90	42,23	52,67
$\bar{x}$		29,19	36,49	47,33	59,39
s		5,88	6,74	4,62	6,76
SEM		3,40	3,89	2,67	3,90
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	13,78	25,06	39,56	71,94
	27	15,68	25,80	43,49	71,54
	28	18,76	39,97	25,85	55,08
	30	12,97	32,13	25,70	63,65
	31	23,81	35,54	42,34	63,20
	32	19,24	32,12	39,64	66,16
	33	16,53	25,95	46,03	72,24
$\bar{x}$		17,25	30,94	37,52	66,26
s		3,71	5,65	8,33	6,29
SEM		1,40	2,13	3,15	2,38
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	12,82	29,90	28,66	66,82
	37	15,76	26,50	42,24	71,05
	38	21,85	38,54	33,63	59,31
	39	7,37	31,27	15,07	63,95
	41	13,79	25,26	38,23	70,02
	42	20,47	37,46	31,57	57,77
	43	19,74	33,27	37,05	62,43
	44	13,66	28,87	32,48	68,66
$\bar{x}$		15,68	31,38	32,37	65,00
s		4,82	4,80	8,18	4,94
SEM		1,70	1,70	2,89	1,75
Dexamethason-Gruppe 24 h (n=10)	45	14,71	27,21	38,09	70,45
	46	13,11	25,28	36,88	71,14
	47	16,94	26,38	45,79	71,29
	48	21,05	25,28	58,03	69,68
	49	19,99	29,30	46,04	67,50
	50	18,68	26,64	48,70	69,45
	51	28,24	40,17	39,43	56,09
	52	22,56	34,14	34,57	52,33
	53	22,36	33,85	41,54	62,90
	54	16,05	26,51	40,92	67,58
$\bar{x}$		19,37	29,48	43,00	65,84
s		4,46	4,97	6,89	6,66
SEM		1,41	1,57	2,18	2,11

9.2.2.5 Zahl der B220⁺CD3⁺-Zellen (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-nummer	B220 ⁺ CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Leukozyten	in % der Lymphozyten
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	2,56	3,70
	2	2,62	3,70
	3	2,77	4,30
$\bar{x}$		2,65	3,90
s		0,11	0,35
SEM		0,06	0,20
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	0,88	1,89
	5	0,88	1,73
	7	0,76	1,94
	8	1,04	1,89
	9	3,35	7,87
$\bar{x}$		1,38	3,06
s		1,10	2,69
SEM		0,49	1,20
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	0,36	0,70
	11	0,46	0,74
	12	0,45	1,07
	13	0,50	0,87
	14	0,81	1,58
	15	0,48	1,35
$\bar{x}$		0,51	1,05
s		0,15	0,35
SEM		0,06	0,14
Dexamethason-Gruppe 7 h (n=6)	16	0,52	1,94
	17	0,58	1,97
	18	0,95	3,98
	19	0,59	2,11
	20	0,48	2,86
	21	0,70	2,59
$\bar{x}$		0,64	2,58
s		0,17	0,78
SEM		0,07	0,32

9.2.2.6 Zahl der B220⁺CD3⁺-Zellen (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-nummer	B220 ⁺ CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Leukozyten	in % der Lymphozyten
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	2,64	3,23
	23	2,84	3,67
	24	3,19	3,98
$\bar{x}$		2,89	3,63
s		0,28	0,38
SEM		0,16	0,22
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	1,51	2,74
	27	1,43	2,35
	28	2,26	4,81
	30	1,54	3,81
	31	0,48	0,71
	32	0,84	1,41
	33	0,98	1,54
$\bar{x}$		1,29	2,48
s		0,58	1,44
SEM		0,22	0,54
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	1,30	3,02
	37	1,12	1,89
	38	1,09	1,92
	39	0,96	4,07
	41	2,45	4,48
	42	2,50	4,58
	43	1,57	2,65
	44	1,12	2,36
$\bar{x}$		1,51	3,12
s		0,62	1,11
SEM		0,22	0,39
Dexamethason-Gruppe 24 h (n=10)	45	1,18	2,19
	46	1,73	3,33
	47	1,23	1,91
	48	3,91	4,69
	49	1,99	2,92
	50	2,45	3,50
	51	2,36	3,35
	52	2,09	3,17
	53	1,96	2,97
	54	3,43	5,67
$\bar{x}$		2,23	3,37
s		0,87	1,10
SEM		0,28	0,35

9.2.3 Befunde der Milz

9.2.3.1 Milzgewichte und Gesamtzellzahl der Milz (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	Milzgewicht [mg]	Gesamtzellzahl $\times 10^7$ / Milz
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	134	14,49
	2	134	13,10
	3	99	13,04
$\bar{x}$		122,33	13,54
s		20,21	0,82
SEM		11,67	0,47
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	87	14,36
	5	124	19,01
	7	155	26,04
	8	163	22,56
	9	133	15,77
$\bar{x}$		132,4	19,55
s		29,91	4,81
SEM		13,38	2,15
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	121	21,45
	11	82	13,62
	12	68	9,13
	13	189	32,18
	14	91	12,27
	15	86	15,37
$\bar{x}$		106,17	17,34
s		44,18	8,34
SEM		18,04	3,41
Dexamethason-Gruppe 7 h (n=6)	16	124	20,27
	17	108	18,69
	18	121	18,10
	19	105	13,58
	20	100	9,50
	21	107	13,83
$\bar{x}$		110,83	15,66
s		9,5	4,05
SEM		3,88	1,65
Präfinal oder agonal getötete Tiere (vgl. Auswertung Tabelle 1 und 2)			
LPS-Gruppe 7 h	6	128	16,72
LPS-Gruppe 24 h	26	114	21,09
LPS-Gruppe 24 h	29	167	18,18
LPS-Gruppe 24 h	34	132	19,84
Imexon-Gruppe 24 h	36	86	12,67
Imexon-Gruppe 24 h	40	160	23,96
$\bar{x}$		131,17	18,74
s		29,87	3,88
SEM		12,19	1,58

9.2.3.2 Milzgewichte und Gesamtzellzahl der Milz (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	Milzgewicht [mg]	Gesamtzellzahl $\times 10^7$ / Milz
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	121	24,20
	23	112	24,19
	24	154	28,94
$\bar{x}$		129	25,78
s		22,11	2,74
SEM		12,77	1,58
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	111	15,10
	27	121	21,88
	28	102	17,65
	30	100	18,09
	31	171	27,70
	32	112	13,44
	33	133	19,53
$\bar{x}$		121,43	19,06
s		24,58	4,71
SEM		9,29	1,78
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	89	8,99
	37	83	14,22
	38	133	26,91
	39	58	8,51
	41	115	19,37
	42	126	18,90
	43	117	17,72
	44	110	17,85
$\bar{x}$		103,88	16,56
s		25,16	5,99
SEM		8,9	2,12
Dexamethason-Gruppe 24 h (n=10)	45	65	14,65
	46	125	24,38
	47	128	19,78
	48	122	21,50
	49	96	17,68
	50	106	9,43
	51	115	21,34
	52	117	23,08
	53	96	16,00
	54	105	15,40
$\bar{x}$		107,5	18,32
s		18,75	4,57
SEM		5,93	1,44

9.2.3.3 FACS-Analyse der Milz

9.2.3.3.1 Zahl der Gesamtlymphozyten (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	Lymphozyten	
		in % der Leukozyten	$\times 10^7$ / Milz
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	87,13	12,62
	2	90,05	11,80
	3	92,55	12,07
$\bar{x}$		89,91	12,16
s		2,71	0,42
SEM		1,57	0,24
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	91,60	13,15
	5	89,86	17,08
	7	91,75	23,89
	8	92,47	29,86
	9	90,80	14,32
$\bar{x}$		91,30	19,66
s		1,00	7,06
SEM		0,45	3,16
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	92,28	19,79
	11	93,55	12,74
	12	91,17	8,32
	13	91,35	29,40
	14	91,69	11,25
	15	91,46	14,06
$\bar{x}$		91,92	15,93
s		0,89	7,61
SEM		0,36	3,11
Dexamethason-Gruppe 7 h (n=6)	16	86,30	17,49
	17	90,35	16,89
	18	87,91	15,91
	19	91,64	12,45
	20	86,53	8,22
	21	91,08	12,60
$\bar{x}$		88,97	13,93
s		2,35	3,52
SEM		0,96	1,44
Präfinal oder agonal getötete Tiere (vgl. Auswertung Tabelle 1 und 2)			
LPS-Gruppe 7 h	6	93,50	15,63
LPS-Gruppe 24 h	26	90,00	18,98
LPS-Gruppe 24 h	29	89,74	16,31
LPS-Gruppe 24 h	34	90,95	18,04
Imexon-Gruppe 24 h	36	89,31	11,32
Imexon-Gruppe 24 h	40	91,14	21,84
$\bar{x}$		90,77	17,02
s		1,51	3,55
SEM		0,62	1,45

9.2.3.3.2 Zahl der Gesamtlymphozyten (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	Lymphozyten	
		in % der Leukozyten	$\times 10^7$ / Milz
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	93,41	22,61
	23	89,24	21,59
	24	90,03	26,05
$\bar{x}$		90,89	23,42
s		2,22	2,34
SEM		1,28	1,35
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	86,87	13,12
	27	86,85	19,00
	28	80,74	14,25
	30	86,61	15,67
	31	85,46	23,67
	32	86,33	11,60
	33	85,74	16,75
$\bar{x}$		85,51	16,29
s		2,17	4,05
SEM		0,82	1,53
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	82,69	7,43
	37	85,36	12,14
	38	89,01	23,95
	39	90,17	7,67
	41	83,90	16,25
	42	81,07	15,32
	43	82,59	14,63
	44	86,25	15,40
$\bar{x}$		85,13	14,10
s		3,21	5,28
SEM		1,14	1,86
Dexamethason- Gruppe 24 h (n=10)	45	82,09	12,03
	46	84,39	20,57
	47	82,21	16,26
	48	86,59	18,62
	49	86,79	15,34
	50	88,57	8,35
	51	85,70	18,29
	52	88,22	20,36
	53	82,94	13,27
	54	82,67	12,43
$\bar{x}$		85,02	15,55
s		2,49	4,01
SEM		0,79	1,27

9.2.3.3.3 Zahl der B- und T-Lymphozyten (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-nummer	B220 ⁺ -Zellen		CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Lymphozyten	x 10 ⁷ / Milz	in % der Lymphozyten	x10 ⁷ / Milz
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	51,15	6,46	41,88	5,29
	2	44,26	5,22	39,75	4,69
	3	49,98	6,03	40,87	4,93
$\bar{x}$		48,46	5,90	40,83	4,97
s		3,69	0,63	1,07	0,30
SEM		2,13	0,36	0,62	0,17
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	58,83	7,74	30,65	4,03
	5	56,28	9,61	34,41	5,88
	7	46,80	11,18	39,44	9,42
	8	50,79	10,60	29,24	6,10
	9	50,43	7,22	21,52	3,08
$\bar{x}$		52,63	9,27	31,05	5,70
s		4,85	1,74	6,63	2,43
SEM		2,17	0,78	2,97	1,09
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	53,06	10,50	35,76	7,08
	11	52,08	6,64	35,43	4,51
	12	57,61	4,80	32,95	2,74
	13	52,76	15,51	38,99	11,64
	14	57,69	6,49	31,35	3,53
	15	58,58	8,23	33,00	4,64
$\bar{x}$		55,30	8,70	34,58	5,69
s		2,95	3,85	2,73	3,26
SEM		1,21	1,57	1,11	1,33
Dexamethason-Gruppe 7 h (n=6)	16	58,98	10,32	22,12	3,87
	17	52,37	8,84	40,40	6,82
	18	54,70	8,70	33,96	5,40
	19	59,40	7,39	29,05	3,62
	20	50,39	4,14	32,74	2,69
	21	56,73	7,15	37,01	4,66
$\bar{x}$		55,43	7,76	32,55	4,51
s		3,62	2,11	6,40	1,46
SEM		1,48	0,86	2,61	0,60
Präfinal oder agonal getötete Tiere (vgl. Auswertung Tabelle 1 und 2)					
LPS-Gruppe 7 h	6	63,28	9,89	27,37	4,28
LPS-Gruppe 24 h	26	51,50	9,78	29,91	5,68
LPS-Gruppe 24 h	29	59,43	9,70	23,96	3,91
LPS-Gruppe 24 h	34	55,42	10,00	34,41	6,21
Imexon-Gruppe 24 h	36	46,26	5,23	30,98	3,51
Imexon-Gruppe 24 h	40	49,42	10,79	25,09	5,48
$\bar{x}$		54,22	9,23	28,62	4,85
s		6,39	2,00	3,91	1,09
SEM		2,61	0,82	1,60	0,44

9.2.3.3.4 Zahl der B- und T-Lymphozyten (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tier-nummer	B220 ⁺ -Zellen		CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Lymphozyten	x 10 ⁷ / Milz	in % der Lymphozyten	x10 ⁷ / Milz
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	50,66	11,45	42,91	9,70
	23	48,03	10,37	39,51	8,53
	24	47,87	12,47	31,34	8,17
$\bar{x}$		48,85	11,43	37,92	8,80
s		1,57	1,05	5,95	0,80
SEM		0,90	0,61	3,43	0,46
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	62,16	8,15	31,96	4,19
	27	57,58	10,94	38,00	7,22
	28	55,20	7,87	32,12	4,58
	30	52,96	8,30	38,07	5,96
	31	51,36	12,16	37,07	8,77
	32	46,10	5,35	32,72	3,80
	33	57,41	9,61	33,95	5,68
$\bar{x}$		54,68	8,91	34,84	5,74
s		5,16	2,23	2,78	1,78
SEM		1,95	0,84	1,05	0,67
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	58,71	4,36	35,85	2,66
	37	47,99	5,83	44,09	5,35
	38	53,29	12,76	42,04	10,07
	39	52,54	4,03	40,70	3,12
	41	58,02	9,43	32,96	5,36
	42	58,62	8,98	35,15	5,39
	43	56,27	8,23	35,02	5,12
	44	54,90	8,45	38,63	5,95
$\bar{x}$		55,04	7,76	38,06	5,38
s		3,70	2,91	3,93	2,23
SEM		1,31	1,03	1,39	0,79
Dexamethason-Gruppe 24 h (n=10)	45	53,04	6,38	38,50	4,63
	46	44,70	9,20	40,45	8,32
	47	50,71	8,25	42,81	6,96
	48	53,21	9,91	36,60	6,81
	49	54,16	8,31	39,64	6,08
	50	46,63	3,89	49,04	4,10
	51	60,11	10,99	34,89	6,38
	52	58,53	11,92	35,61	7,25
	53	52,94	7,03	41,33	5,48
	54	63,76	7,93	29,96	3,73
$\bar{x}$		53,78	8,38	38,88	5,97
s		5,84	2,32	5,16	1,47
SEM		1,85	0,73	1,63	0,47

9.2.3.3.5 Zahl der B220⁺CD3⁺-Zellen (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	B220 ⁺ CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Lymphozyten	$\times 10^7$ / Milz
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	5,20	0,66
	2	14,16	1,67
	3	7,63	0,92
$\bar{x}$		9,00	1,08
s		4,63	0,52
SEM		2,68	0,30
LPS-Gruppe 7 h (n=5)	4	8,04	1,06
	5	7,40	1,26
	7	10,95	2,62
	8	18,05	3,77
	9	25,33	3,63
$\bar{x}$		13,95	2,47
s		7,63	1,28
SEM		3,41	0,57
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	8,79	1,74
	11	10,59	1,35
	12	6,11	0,51
	13	6,89	2,03
	14	8,60	0,97
	15	4,77	0,67
$\bar{x}$		7,63	1,21
s		2,10	0,60
SEM		0,86	0,25
Dexamethason- Gruppe 7 h (n=6)	16	15,79	2,76
	17	4,87	0,82
	18	9,00	1,43
	19	9,61	1,20
	20	14,17	1,16
	21	3,86	0,49
$\bar{x}$		9,55	1,31
s		4,79	0,78
SEM		1,96	0,32
Präfinal oder agonal getötete Tiere (vgl. Auswertung Tabelle 1 und 2)			
LPS-Gruppe 7 h	6	8,00	1,25
LPS-Gruppe 24 h	26	15,90	3,02
LPS-Gruppe 24 h	29	14,10	2,30
LPS-Gruppe 24 h	34	6,38	1,15
Imexon-Gruppe 24 h	36	20,31	2,30
Imexon-Gruppe 24 h	40	23,17	5,06
$\bar{x}$		14,64	2,51
s		6,62	1,43
SEM		2,70	0,59

9.2.3.3.6 Zahl der B220⁺CD3⁺-Zellen (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	B220 ⁺ CD3 ⁺ -Zellen	
		in % der Lymphozyten	x10 ⁷ / Milz
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	5,22	1,18
	23	11,72	2,53
	24	19,02	4,96
$\bar{x}$		11,99	2,89
s		6,90	1,92
SEM		3,99	1,11
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	2,80	0,37
	27	2,10	0,40
	28	9,57	1,36
	30	6,27	0,98
	31	9,42	2,23
	32	8,88	1,03
	33	6,30	1,05
$\bar{x}$		6,48	1,06
s		3,08	0,63
SEM		1,16	0,24
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	2,15	0,16
	37	2,56	0,31
	38	2,21	0,53
	39	3,73	0,29
	41	6,02	0,98
	42	2,16	0,33
	43	4,89	0,72
	44	2,90	0,45
$\bar{x}$		3,33	0,47
s		1,45	0,27
SEM		0,51	0,09
Dexamethason- Gruppe 24 h (n=10)	45	4,04	0,49
	46	12,11	2,49
	47	3,62	0,59
	48	18,17	3,38
	49	2,66	0,41
	50	1,83	0,15
	51	1,87	0,34
	52	3,38	0,69
	53	2,65	0,35
	54	4,61	0,57
$\bar{x}$		5,49	0,95
s		5,35	1,08
SEM		1,69	0,34

9.2.3.4 Morphometrie

9.2.3.4.1 Diameter der B-Zellfollikel (7 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	Mittelwert der kleinsten Follikel-Diameter [mm]	Mittelwert der größten Follikel-Diameter [mm]
Kontrollgruppe 7 h (n=3)	1	186,28	296,5
	2	187,96	302,16
	3	169,19	234
	$\bar{x}$	181,14	277,55
	s	10,38	37,82
	SEM	6	21,84
LPS-Gruppe 7 h (n=7)	4	195,96	326,44
	5	214,3	330,2
	7	222,04	360,56
	8	225,25	414,97
	9	219,91	349,21
	$\bar{x}$	215,49	356,28
	s	11,62	35,65
	SEM	5,2	15,94
Imexon-Gruppe 7 h (n=6)	10	221,58	381,09
	11	190,59	293,13
	12	214,63	336,07
	13	271,87	381,17
	14	220,64	333,4
	15	236,68	302,29
	$\bar{x}$	226	337,86
	s	27,02	37,51
	SEM	11,03	15,31
Dexamethason- Gruppe 7 h (n=6)	16	251,01	339,54
	17	191,28	301,75
	18	230,51	399,12
	19	235,4	326,2
	20	214,64	288,8
	21	230,55	343,61
	$\bar{x}$	225,57	333,17
	s	20,44	38,74
	SEM	8,34	15,81
Präfinal oder agonal getötete Tiere (vgl. Auswertung Tabelle 1 und 2)			
LPS-Gruppe 7 h	6	213,51	337,11
LPS-Gruppe 24 h	26	220,7	353,22
LPS-Gruppe 24 h	29	211,01	357,36
LPS-Gruppe 24 h	34	206,41	321,61
Imexon-Gruppe 24 h	36	194,01	285,16
Imexon-Gruppe 24 h	40	191,36	313,1
	$\bar{x}$	206,17	327,92
	s	11,45	27,12
	SEM	4,67	11,07

9.2.3.4.2 Diameter der B-Zellfollikel (24 h -Werte)

Gruppe und Anzahl (n) der Tiere pro Gruppe	Tiernummer	Mittelwert der kleinsten Follikel-Diameter [mm]	Mittelwert der größten Follikel-Diameter [mm]
Kontrollgruppe 24 h (n=3)	22	158,36	258,45
	23	184,04	283,18
	24	186,54	341,42
$\bar{x}$		176,31	294,35
s		15,6	42,6
SEM		9	24,6
LPS-Gruppe 24 h (n=7)	25	192,34	276,25
	27	215,9	308,72
	28	214,69	287,72
	30	189,36	259,71
	31	192,4	283,03
	32	220,57	323,51
	33	202,91	289,15
$\bar{x}$		204,02	289,73
s		13,02	20,95
SEM		4,92	7,92
Imexon-Gruppe 24 h (n=8)	35	209,40	325,50
	37	181,19	258,79
	38	221,49	330,78
	39	181,93	274,5
	41	214,44	319,99
	42	185,64	257,75
	43	197,45	316,59
	44	203,87	218,59
$\bar{x}$		199,42	287,81
s		15,42	41,14
SEM		5,45	14,54
Dexamethason- Gruppe 24 h (n=10)	45	186,20	237,94
	46	174,45	261,37
	47	180,61	249,11
	48	165,96	282,12
	49	190,47	255,73
	50	166,16	241,9
	51	218,21	299,87
	52	187,44	258,82
	53	198,82	272,11
	54	181,43	256,70
$\bar{x}$		184,97	261,57
s		15,61	18,76
SEM		4,94	5,93

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. I. Käufer-Weiß danke ich für die Vertretung der Doktorarbeit vor dem Fachbereich und für die gründliche Durchsicht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Hartig für die Überlassung des Themas und sein nicht nachlassendes fachliches und menschliches Engagement sowie die Korrektur der Arbeit.

Der Firma Roche Diagnostics ehemals Boehringer Mannheim und Herrn Privatdozent Dr. W. Rebel danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in der Abteilung für Pathologie und Toxikologie der medizinischen Forschung.

Ich danke Herrn Dr. U. Deschl für die vielfältigen Anregungen bei der Auswertung und der Zusammenstellung der Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Pathologie und Toxikologie der medizinischen Forschung der Firma Roche Diagnostics ehemals Boehringer Mannheim für die freundliche Aufnahme und Unterstützung und besonders Frau G. Dietmann, die mich fachlich, technisch, menschlich und mit großem Engagement bei den histologischen Auswertungen unterstützt hat und Frau U. Köhl, die mir bis zur endgültigen Fertigstellung der Arbeit stets hilfsbereit zur Seite gestanden hat.

Ich danke Herrn Dr. J. Schmitt für die Einführung in die Technik der zytofluometrischen Analysen.

Für die Möglichkeit der morphometrischen Auswertung meiner Ergebnisse und die Einführung in die Technik danke ich Prof. Dr. D. Fahimi und den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie II der Universität Heidelberg.

Herrn Dr. K. Krämer danke ich für die flexible Gestaltung der Arbeitszeit in meiner Praxistätigkeit, die mir die Durchführung der sehr Arbeit erleichtert hat.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann Kai für seine Geduld und seine Unterstützung bei allen Problemen der Datenverarbeitung.

