

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer

**Zytokinverlauf im Akuten Leberversagen:
Vergleich zwischen Hepatektomie und Amanitinintoxikation
am Großtiermodell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Alexander Mathias Philipp Etspüler

aus Mühlacker

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. A. Königsrainer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. U. Lauer

1. Einleitung	5
1.1. Das akute Leberversagen	6
1.2. SIRS, Sepsis, Septischer Schock	7
1.3. Zytokine	8
1.4. Leberregeneration	12
1.5. In vivo Modelle des akuten Leberversagens	15
1.5.1. Chirurgische Modelle	16
1.5.2. Intoxikationsmodelle	16
1.6. Fragestellung	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	19
2.1.1. Rechtliche Grundlagen	19
2.1.2. Tiere	19
2.1.3. Gewinnung der Untersuchungsmaterialien	19
2.1.4. Interleukin-6 Messung (Hepatektomie)	20
2.1.5. TNF- α Messung (Hepatektomie)	21
2.1.6. TNF- α und IL-6 Messung (Intoxikation)	22
2.2. Methoden	22
2.2.1. Anästhesie	22
2.2.2. Chirurgischer Eingriff	23
2.2.3. Intoxikation	26
2.2.4. Intensivtherapie	26
2.2.5. Herstellung der Blutprodukte	27
2.2.6. Messung der IL-6 Konzentrationen (Hepatektomie)	27
2.2.7. Messung der TNF- α Konzentration (Hepatektomie)	28
2.2.8. Messung IL-6 und TNF- α (Intoxikation)	28
3. Ergebnisse	30
3.1. Hepatektomie	31
3.1.1. Überlebenszeit	31
3.1.2. IL-6	31
3.1.3. TNF- α	32
3.1.4. Leukozyten	32
3.1.5. Körperkerntemperatur	34
3.2. Intoxikation	35
3.2.1. IL-6	35
3.2.2. TNF- α	38
3.2.3. Leukozyten	39
3.2.4. Temperatur	41
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung	50
Abkürzungsverzeichnis	53
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	55
Lebenslauf	66
Literaturverzeichnis	56

1. Einleitung

1.1. Das akute Leberversagen

Das akute Leberversagen (engl. Acute Liver Failure; ALF) beschreibt eine seltene, schwere Beeinträchtigung der Leberfunktion. Klinisch stehen dabei die verminderte Synthese von Gerinnungs- und Transportproteinen (Koagulopathie mit einem INR > 1,5), die eingeschränkte Detoxifikation von exogenen und endogenen Schadstoffen (Bilirubin > 2 mg/dl) und die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie (HE) im Vordergrund (38;67). Definitionsgemäß darf zur Diagnosestellung ALF keine vorbestehende Lebererkrankung oder Leberfunktionsstörung vorliegen.

In westlichen Ländern wird die Inzidenz des ALF auf einen bis sechs Fälle pro eine Million Einwohner geschätzt (8).

Die Ursachen für die Entstehung eines ALF variieren endemisch. In Deutschland bilden die Hepatitiden mit bis zu 65% die Hauptursache, 30% sind auf Intoxikationen mit Hepatotoxinen zurückzuführen (38;60). Im angloamerikanischen Raum hingegen werden bis zu 50% der Fälle durch medikamentös-toxische Leberschädigungen mit Acetaminophen (Paracetamol) verursacht (66). Seltener Ätiologien sind weltweit auftretende Vergiftungen durch Amatoxine, welche in verschiedenen Pilzspezies vorkommen, 3,4-Methylenedioxyamphetamin („Ecstasy“) oder Chemikalien wie Tetrachlorkohlenstoff, gefolgt von Komplikationen der Schwangerschaft (HELLP-Syndrom, akute Schwangerschaftsfettleber), Schockleber, M. Wilson und dem Budd-Chiari-Syndrom (38). Im weiteren Sinne kann auch das primäre Transplantatversagen nach orthotoper Lebertransplantation unter dem Begriff ALF subsumiert werden.

Als Komplikationen treten beim ALF neben Koagulopathie und HE, zerebrale Ödeme, respiratorische und kardiovaskuläre Insuffizienz, metabolische Störungen und das Nierenversagen auf. Studien belegen zunehmend die zentrale Rolle der systemischen Immunantwort in Pathogenese und Outcome des ALF (7). Das Auftreten eines ‚Systemic Inflammatory Response Syndrome‘ (SIRS) ist dabei mit einer Progression der HE und einem schlechteren Outcome verbunden (91;119).

Studien aus den USA zeigen, dass Patienten mit einem ALF in 45% der Fälle spontan regenerieren, 50% müssen einer orthotopen Lebertransplantation (OLT) zugeführt werden und rund 30% der Patienten sterben im Leberversagen (38;67;78).

Trotz vieler Fortschritte im Verständnis um die Pathophysiologie und die symptomatische Therapie des ALF konnte bisher, außer für die Lebertransplantation, für keine therapeutische Intervention ein signifikanter Überlebensvorteil gezeigt werden (14;101).

1.2. SIRS, Sepsis, Septischer Schock

Das SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) wird definiert als eine immunologische Antwort des Körpers auf einen internen oder externen Reiz (11). Neben systemischen Infektionen können auch nicht infektiologische Faktoren wie Polytrauma oder große chirurgische Eingriffe, Ischämie, Verbrennung, hämorrhagischer Schock, Pankreatitis und schwere Organdysfunktionen ein SIRS nach sich ziehen (12;18;68;73;81;88). Die Diagnose eines SIRS kann bei Auftreten von mindestens zwei der folgenden Kriterien gestellt werden:

(a) Körpertemperatur über 38° oder unter 36° C; (b) Herzfrequenz über 90 Schläge pro Minute; (c) Tachypnoe mit mehr als 20 Atemzügen pro Minute oder Hyperventilation mit einem arteriellen CO₂-Partialdruck von unter 32 mmHg; (d) Leukozyten über 12000 oder unter 4000 / μ l oder mehr als 10% segmentkernige Granulozyten (11).

Treten diese Symptome im Zusammenhang mit einer Infektion des Organismus auf, ergibt sich die Diagnose Sepsis. Kommen im weiteren Verlauf Organdysfunktionen hinzu, spricht man von einer schweren Sepsis und, in Kombination mit einer katecholaminpflichtigen Hypotension trotz ausreichender Flüssigkeitssubstitution, vom septischen Schock (11), wobei der Übergang zwischen den Formen als Kontinuum anzusehen ist. Häufige Komplikationen wie Adult Respiratory Distress Syndrome, disseminierte intravasale Gerinnung, akutes Nierenversagen und Multiorganversagen treten dabei in den einzelnen Stufen mit zunehmender Inzidenz auf (88).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die auslösende Immunreaktion, welche zu einem SIRS führt, durch die Erhöhung von pro- (z. B. TNF- α , IL-1 und IL-6) und antiinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-10) charakterisiert ist (7;81;89;108). Dies trifft im Besonderen auch auf die Entstehung des SIRS beim ALF zu (90), wobei die Höhe der ausgeschütteten Zytokine mit der Schwere der resultierenden Organdysfunktionen und der Letalität der Patienten korreliert (7;12;89).

Die 28-Tage Letalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks liegt bei verschiedenen Autoren zwischen 30 und 55% (20;36;78;96). Langzeituntersuchungen ergaben eine Letalität septischer Patienten bis zu 82% in 8 Jahren (85).

Patienten mit ALF sind anfälliger für Infektionen und damit für die Entwicklung einer Sepsis. Dies ist auf eine geringere Produktion von Komplementfaktoren und Oponinen und der Schwächung des angeborenen Immunsystems zurückzuführen (64). Rolando et al. konnten Infektionshäufigkeiten zwischen 50 und 90% nachweisen (7;91;119). Die Infektionen treten dabei schon in der Frühphase (2-5 Tage nach Hospitalisierung) des ALF auf und sind in mindestens einem Viertel der Fälle für den Tod als Langzeitfolge verantwortlich (7). Mit zunehmender Anzahl an SIRS Diagnosekriterien steigt die Letalität deutlich an (91).

1.3. Zytokine

Zytokine werden als eines der Bindeglieder zwischen der spezifischen und unspezifischen Immunität betrachtet, da sie von Zellen beider Systeme freigesetzt werden und ihren Einfluss ebenfalls auf beide Komponenten der Immunabwehr ausüben. Zur ihren Hauptaufgaben gehören neben der Auslösung von Entzündungsreaktionen auch die Regulation des Wachstums und der Differenzierung von Zellen des hämatopoetischen und des Immunsystems (52;82).

Zytokine sind von Immun- und Nichtimmunzellen produzierte Proteine, die je nach ausschüttender Zelle auch Lymphokine oder Monokine genannt werden und zu denen auch Interleukine und Wachstumsfaktoren (z. B. colony-stimulating factor etc.) zählen (1). Das Molekulargewicht der Zytokine beträgt zwischen 10 und 50 kDa. Sie sind schon in sehr niedrigen Konzentrationen (10^{-10} bis 10^{-12} M) wirksam und stellen ein elementares Kommunikationssystem für eine Vielzahl von Prozessen dar. Hierzu können sie sowohl autokrin, parakrin als auch endokrin auf Zielzellen wirken. Zytokine wirken auf viele verschiedene Zelltypen, können aber auch verschiedenartige Effekte auf die gleiche Zielzelle haben. Weiterhin ist die Wirkung der Zytokine oft redundant. Verschiedene Zytokine wirken also auf bestimmte Zellen ähnlich oder auch überschneidend. Sie beeinflussen die Synthese anderer Zytokine oder deren Wirkung, wodurch Kaskaden entstehen, die wichtige positive und negative Regulationsmechanismen für die Immun- und Entzündungsantwort

darstellen. Dabei ist die einzelne Zytokinreaktion in der Regel ein kurzer selbstlimitierender Vorgang (1;52;82).

Im Folgenden werden die für diese Arbeit wichtigen Zytokine IL-6 und TNF- α genauer beschrieben.

1.3.1. Interleukin 6

IL-6 ist ein Zytokin mit einer molekularen Masse von 26 kDa, welches von mononukleären Phagozyten, T-Zellen, Gefäßendothelzellen und Fibroblasten als Antwort auf eine IL-1 und TNF- α Freisetzung synthetisiert wird (1).

IL-6 ist ein klassisches Beispiel für ein multifunktionelles Zytokin. Ursprünglich wurde es als B-Zell Differenzierungsfaktor entdeckt, welches den letzten Schritt in der Entwicklung der B-Zelle hin zur antikörperproduzierenden Zelle auslöst (39;40). Weitere Versuche haben allerdings bald gezeigt, dass es nicht nur auf B-Zellen sondern auch auf T-Zellen, Hepatozyten, hämatopoetische Progenitorzellen, Myelom- und Plasmazytomzellen und sogar neuronale Zellen wirkt (3;47;51;53;117). IL-6 wirkt als hepatozytenstimulierender Faktor und induziert die Bildung diverser Akute-Phase-Proteine (5;33) wie zum Beispiel das C-reaktive Protein und das mannanbindende Lektin (45). In Untersuchungen an IL-6-knock-out Mäusen war die Akute-Phase- und die Immunglobulin-Antwort stark vermindert (57).

Beim ALF konnte für IL-6 eine wichtige protektive Rolle nachgewiesen werden. IL-6 knock-out Mäuse zeigten erhöhte Sensibilität für Leberschäden, schlechtere Regenerationsleistung und eine erhöhte Letalität (43;44;71;84). Experimentelle Daten legen nahe, dass der hepatoprotektive Effekt beim ALF über die Aktivierung des STAT3 Signalweges zur Induktion von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2, Bcl-x_l und FLIP und die Hemmung der NKT-Zellen führt (59;104;109).

Die Funktion des IL-6 wird nachfolgend in einer modifizierten Tabelle nach Kishimoto et al. und Possamai et al. (52;84) zusammengefasst.

Wirkung auf B-Zellen	Ig-Produktion Proliferation von Myelomzellen Proliferation von Epstein-Barr Virus infizierten Zellen
Wirkung auf T-Zellen	Proliferation und Differenzierung von T-Zellen Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten Induktion der IL-2R Expression und der IL-2 Produktion Verstärkung der NK-Zell-Aktivität

Wirkung auf murine hämatopoetische Progenitorzellen	Vergrößerung von multipotenten hämatopoetischen Kolonien
Wirkung auf Megakariozyten	Reifung der Megakariozyten
Wirkung auf Makrophagen	Wachstumshemmung myeloischer leukämischer Zelllinien und Induktion derer Differenzierung zu Makrophagen
Wirkung auf Hepatozyten	Hepatozytenstimulierung und Akute-Phase-Proteinsynthese (z. B. CRP, Fibrinogen) Hemmung der TNF- α Sekretion Aktivierung des Signalweges STAT3 Induktion von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2, Bcl-x _l , FLIP
Wirkung auf den Knochenstoffwechsel	Stimulierung von Osteoklasten und Induktion der Knochenresorption
Wirkung auf Blutgefäße	Induktion des platelet-derived growth factor (PDGF) Proliferation der vaskulären glatten Muskulatur
Wirkung auf Herzmuskelzellen	Negativ inotroper Effekt
Wirkung auf neuronale Zellen	Neurale Differenzierung von P12 Zellen Überlebensverlängerung von cholinergen Neuronen Induktion der adrenokortikotropen Hormonsynthese
Wirkung auf die Plazenta	Ausschüttung von humanem Choriongonadotropin (β -hCG)

Tab. 1 Unterschiedliche Funktionen von IL-6 modifiziert nach (52;84)

In der heutigen Labordiagnostik wird IL-6 vorwiegend zur Früherkennung des SIRS bzw. der Sepsis eingesetzt. Erhöhte Serumwerte (über 10 pg/ml abhängig vom Testsystem) sind ein unspezifischer Hinweis für einen systemischen Entzündungsprozess (27). Septische Patienten zeigen erhöhte IL-6 Werte bis weit über das 1000-fache des Normalwertes. Die Sensitivität für IL-6 bei septischen Patienten liegt deutlich höher als die von TNF- α oder IL-10 (89). Die Höhe der IL-6-Spiegel korreliert mit der Schwere der Inflammation und dem Ausmaß der Organdysfunktion im Rahmen einer Sepsis. Darüber hinaus konnten erhöhte IL-6-Spiegel signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert werden (94;99;103). Da der Anstieg von IL-6 im Serum vor anderen Akut-Phase-Proteinen und vor klinischen Infektionszeichen auftritt, gilt IL-6 als früher Indikator inflammatorischer Ereignisse. Auch operative Eingriffe führen zu IL-6-Freisetzung. Die Serumspiegel normalisieren sich jedoch innerhalb weniger Tage wieder. Ein fehlender postoperativer Abfall oder

ein Wiederanstieg von IL-6 kann als Frühmarker einer postoperativen Komplikation interpretiert werden. (26)

1.3.2. Tumornekrosefaktor α

TNF- α ist einer der Hauptfaktoren des Immunsystems gegen gramnegative Bakterien. Letztere bewirken über die Lipopolysaccharide ihrer Zellwand eine Aktivierung der mononukleären Phagozyten, welche als wichtigste TNF- α -sezernierende Zellen gelten. Weitere Produzenten sind antigenstimulierte T-Zellen, aktivierte NK-Zellen und aktivierte Mastzellen. Als beeinflussender Faktor der TNF- α Ausschüttung gilt IFN- γ , welches von T-Zellen sezerniert, die TNF- α Produktion der LPS-stimulierten mononukleären Phagozyten steigert. Dies zeigt, dass TNF- α sowohl ein Mediator der natürlichen als auch der erworbenen Immunität ist und ein wichtiges Bindeglied zwischen der akuten Entzündung und der generalisierten Immunantwort darstellt. Gleichzeitig kann INF- γ einen verstärkenden Effekt auf die TNF- α Wirkung ausüben. Dies weist darauf hin, dass der Organismus einer zu hohen und somit letalen TNF- α Konzentration durch ein paralleles Ausschütten von TNF- α und INF- γ aus aktivierten T-Zellen entgegenwirkt (1).

TNF- α wird als 25 kD großes, nicht glykolysiertes, transmembranäres Protein synthetisiert. Von diesem wird der extrazelluläre Teil proteolytisch abgespalten und lagert sich zu einem 51 kD schweren, stabilen Homotrimer zusammen. Die Wirkung wird über die Bindung an einen Rezeptor an der Zelloberfläche der Zielzelle vermittelt. Der Wirkort hängt von der Menge des sezernierten TNF- α ab. Nur in niedrigen Konzentrationen von ca. 10^{-9} M wirkt es als auto- und parakriner Regulator der Leukozyten- und Endothelzellen. In höheren Konzentrationen wird TNF- α dagegen auch in die Blutbahn sezerniert und kann als endokrines Hormon wirken. Im Falle einer Sepsis mit gramnegativen Bakterien können kurzzeitig Serumkonzentrationen von mehr als 10^{-7} M gemessen werden. Tiere mit derart hohen Serumwerten sterben aufgrund von Schock und disseminierter intravasaler Koagulopathie. TNF- α stellt damit ein Hauptmediator des septischen bzw. des Endotoxin-Schocks dar (1). In nachfolgender Tabelle (Tab. 2) werden die konzentrationsabhängigen Funktionen des TNF- α zusammengefasst.

Labordiagnostisch wird TNF- α als Marker für systemische Infektionen und Organversagen bestimmt, wobei die prognostische Aussagekraft der anderer Parameter (IL-6, IL-10 und PCT) unterlegen ist (37;89). Werte unter 20 pg/ml werden in der Regel als normal definiert (35).

TNF- α Konzentration	Wirkung
Niedrige Konzentration → Auto- und parakrine Wirkung	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhung der Adhäsivität von Endothelzellen gegenüber Leukozyten und umgekehrt, Akkumulation von Leukozyten am Entzündungsherd • Aktivierung von Leukozyten (besonders der Neutrophilen) im Entzündungsherd • Stimulation der Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, TNF-α) der mononukleären Monozyten • Schützender Effekt gegen Viren durch Steigerung der Expression der Klasse I MHC-Moleküle und damit CTL-vermittelte Lyse der viral infizierten Zellen
Höhere Konzentration → Endokrine Wirkung	<ul style="list-style-type: none"> • Wirkung als Pyrogen im Hypothalamus (wie auch IL-1) • Induktion der IL-1- und IL-6-Ausschüttung durch mononukleäre Phagozyten. • Ausschüttung von Serumproteinen aus Hepatozyten* • Aktivierung des Gerinnungssystems durch Derangierung des Gleichgewichts zwischen Prokoagulations- und Antikoagulations-aktivitäten • Supprimierung der Zellteilung der Stammzellen des Knochenmarks** • Kachexie bei Versuchstieren bei längerer Verabreichung durch Induktion von Appetitlosigkeit und Hemmung der Lipoproteinlipase
Extrem hohe Konzentration → Letale Wirkung	<ul style="list-style-type: none"> • Verminderung der Gewebepfusion durch Unterdrückung der Myokardkontraktibilität • Reduktion des Blutdrucks und der Gewebepfusion durch die Entspannung der glatten Muskulatur • Bildung intravaskulärer Thromben, die wiederum zu reduzierter Gewebepfusion führen • Schwere metabolische Störungen wie z. B. Hypoglykämien bis zu letalen Glukosekonzentrationen

Tab. 2 Konzentrationsabhängige Wirkungen des TNF- α modifiziert nach (1)

* Das Spektrum der ausgeschütteten Proteine gleicht der induzierten Ausschüttung durch IL-1, aber nicht dem, der durch IL-6 induzierten Ausschüttung. Das Zusammenspiel der Plasmaproteine, die durch die Wirkung TNF- α , IL-1 und IL-6 ausgeschüttet werden, bedingt die Akute-Phase-Reaktion auf entzündliche Stimuli.

** Eine chronische Verabreichung von TNF- α (z. B. im Rahmen einer Krebstherapie) kann zu einer Kombination von Fieber, erhöhten IL-6-Spiegeln, erhöhten Akute-Phase-Proteinen, Knochenmarkssuppression (Lymphopenie und Immundefizit) und Gerinnungsaktivierung führen.

1.4. Leberregeneration

Der normalerweise geringe Zellumsatz des gesunden Lebergewebes kann im Falle eines Leberschadens in eine massive Hepatozytenproliferation wechseln und zu einer funktionell kompletten Leberregeneration im Sinne einer kompensatorischen

Hyperplasie führen (24;56). Die partielle Hepatektomie (PH) von 65 bis 70% des Lebergewebes (chirurgisch oder durch Ligatur des linken und mittleren Leberlappens) ist in dieser Fragestellung das meistuntersuchte Modell (56), doch sind dieselben Mechanismen, die zur Leberregeneration nach PH führen, auch in Modellen mit direktem Leberzellschaden (z. B. Intoxikation) nachgewiesen (17). Nach PH kommt es zu deutlichen Änderungen der Hämodynamik im verbliebenen Lebergewebe. Bei gleichbleibender arterieller Versorgung verdreifacht sich der portale Blutfluss mit entsprechender Steigerung des Angebotes an Zytokinen und Wachstumsfaktoren pro Hepatozyt, welche der Leber aus dem Abfluss des Intestinum und des Pankreas zugeleitet werden (72) (Abb. 1). Als Trigger der Leberregeneration werden neben den beschriebenen hämodynamischen und metabolische Ursachen auch Endotoxine wie LPS (Lipopolysaccharide) aus dem Portalsstromgebiet vermutet (24).

Nach dem Leberschaden kommt es zu einem raschen Anstieg der Zytokine TNF- α und IL-6 (24), welchen eine entscheidende Rolle in den Signalkaskaden der Leberregeneration zugeschrieben wird (16;58;93;110;123). TNF- α und IL-6 aktivieren in einem ersten Schritt des Regenerationsprozesses das Priming von Hepatozyten (15). Darunter wird ein reversibler Prozess verstanden, der Zellen für die Wirkung von Wachstumsfaktoren wie HGF (hepatic growth factor) und TGF- α (tumor growth factor) sensibilisiert und den in der G₀-Phase ruhenden Zellen den Übertritt in die G₁-Phase ermöglicht (24). In der Proliferationsphase, dem zweiten Schritt der Leberregeneration, kommt es durch die Einwirkung von Wachstumsfaktoren (HGF, TGF- α , EGF (epidermal growth factor), HB-EGF (heparin-binding EGF like growth factor), GH (56) und IGFBP1 (insulin growth factor binding protein 1)) zur Aufnahme der DNA-Replikation und Zellteilung (15) (Abb.1). Dabei erfolgt der Peak in der DNA-Synthese speziesabhängig zwischen 24 Stunden (92) und 7-10 Tagen (Primat) nach PH (23;30). In einem letzten Schritt kommt es zur Terminierung der Leberregeneration. Der gesteigerte metabolische Anspruch an das Restlebergewebe scheint dabei Einfluss sowohl auf die Proliferation der Hepatozyten zu haben als auch, über Inhibitionsfaktoren (u. a. transforming growth factor β (TGF- β) Superfamilie), die Terminierung zu signalisieren (50;62;125). Der zeitliche Ablauf in der Wirkung der Zytokine und Wachstumsfaktoren ist dabei nicht als streng linearer Ablauf, sondern als ein sowohl parallel als auch synchron verlaufender Prozess zu verstehen (72).

Durch Arbeiten mit Knockout-Mäusen für IL-6 (16) und Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR-1) (124) und Anti-TNF Antikörpern (2) konnte folgender Signalweg zur Leberregeneration identifiziert werden:

$TNF-\alpha \rightarrow TNFR-1 \rightarrow NF\kappa B \rightarrow IL-6 \rightarrow STAT3$ (24)

Die Aktivierung dieses Signalweges findet innerhalb von 30 Minuten nach Leberschädigung statt und endet in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT3. TNF-α als proinflammatorisches Zytokin und Vermittler der Akute-Phase-Reaktion überrascht in der Rolle als Auslöser der Leberregeneration. Eine antiapoptotische und proliferative Wirkung entwickelt TNF-α nur unter bestimmten Bedingungen, wie sie beispielsweise bei der partiellen Hepatektomie vorgefunden werden. Es wird vermutet, dass NO und die durch TNF-α/IL-6 ebenfalls induzierte Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) die Leber in diesem Zusammenhang vor der eigentlich zytotoxischen Wirkung des TNF-α schützen (24). Als Quelle der TNF-α Ausschüttung werden die hepatischen Makrophagen (Kupffer-Zellen) angenommen wobei die Produktion durch andere Zellen nicht ausgeschlossen wurde (72).

Die Wirkung des IL-6 im Rahmen der Leberregeneration scheint deutlich komplexer, da Untersuchungen zur Genexpression im Rahmen der Leberregeneration ergaben, dass bis zu 40% dieser Gene IL-6 abhängig sind (69;102;121). Diverse Untersuchungen an Knockout-Mäusen (9;16;31;70;83;122;128) haben gezeigt, dass eine adäquate IL-6 Ausschüttung für eine regelgerechte Immunantwort nach PH benötigt wird. Diese Antwort umfasst neben der Akute-Phase-Reaktion die Apoptosesuppression und, wie gezeigt, die Induktion der Hepatozytenproliferation (129). Darüber hinaus schützt IL-6 die Leberregeneration vor Ischämieschäden (24). IL-6 wird in diesem Zusammenhang ebenfalls von Kupffer-Zellen und vermutlich auch Hepatozyten produziert (4;80).

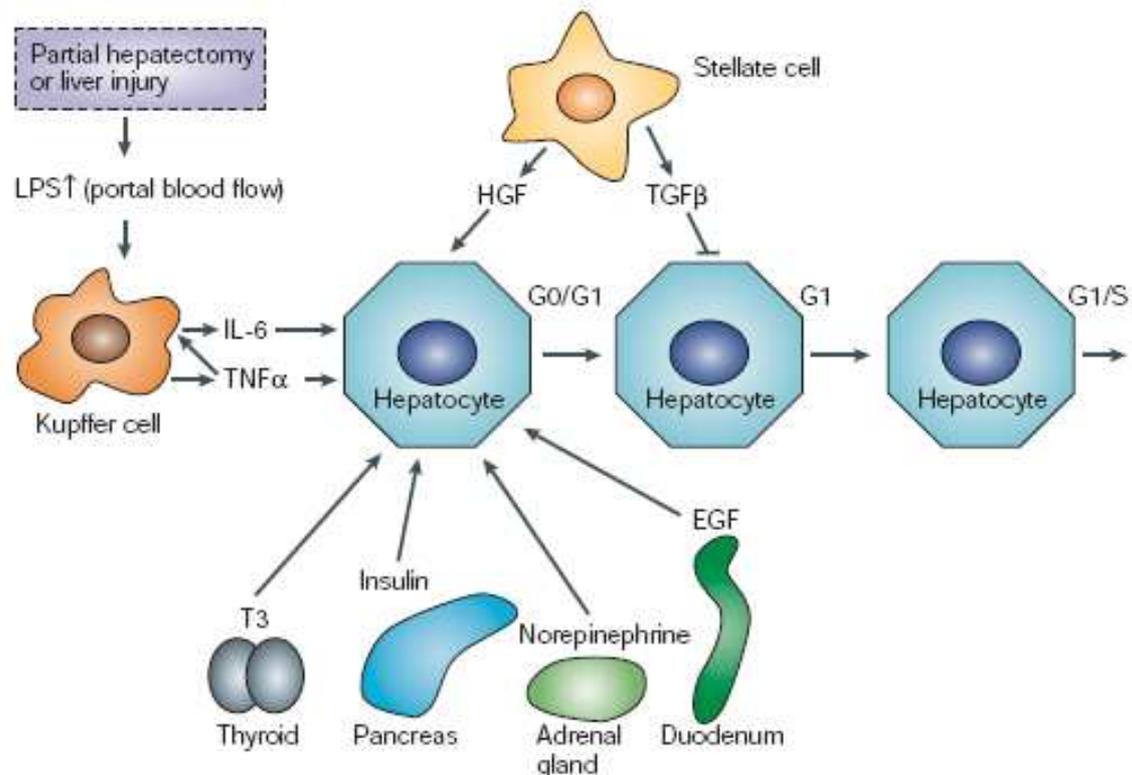


Abb. 1 PH oder direkte Leberzellschäden triggern die Leberregeneration (aus (110))

1.5. In vivo Modelle des akuten Leberversagens

Zur Untersuchung des ALF anhand eines Tiermodells muss dieses bestimmte Kriterien erfüllen (111). Das Modell sollte reversibel sein und somit die Anwendung einer geeigneten Therapie das Überleben von Tiere ermöglichen. Die Ergebnisse sollten reproduzierbar sein, der Tod nach einem ausreichenden Zeitintervall eintreten und das Ausmaß des Leberschadens mess- und standardisierbar sein. Darüber hinaus sollte der Tod eine direkte Folge des ALF sein und die entstehenden Komplikationen dem klinischen Bild des menschlichen ALF entsprechen. Tiermodelle müssen eine entsprechende Größe besitzen, um während des Untersuchungszeitraumes ausreichend Blut- und Gewebeproben sammeln zu können, die Vergleichbarkeit zum menschlichen Organismus gegeben ist und Leberersatzverfahren an ihrer klinischen Belastbarkeitsgrenze getestet werden können. Es sollte zu einem geringst möglichem Gesundheitsrisiko für das Laborpersonal kommen. Letztlich kann die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie nur an einem wachen Tiermodell adäquat beurteilt werden (116).

Die in der Literatur abgebildeten Tierversuchsstudien zum ALF arbeiten hauptsächlich mit Nagern und Schweinen, vereinzelt kommen auch Hunde und Kaninchen zum Einsatz. Die eingesetzten Verfahren sind vorwiegend chirurgische sowie Intoxikationsmodelle (2;21;28;77;86;105;112;114-116;118).

1.5.1. Chirurgische Modelle

Bei der partiellen Hepatektomie werden je nach Spezies zwischen 60 und 95% der Lebermasse entfernt. Dies kann chirurgisch entlang der Lappengrenzen der Leber erfolgen, ohne dabei dem verbleibenden Restlebergewebe Schaden zuzufügen (72). Dieses Modell entspricht dem klinischen Bild der Transplantation eines für den Empfänger zu kleinen Organs (25), wie sie auch bei einer Leberlebendspende auftreten kann oder dem Zustand nach Leberresektion bei großen Lebertumoren (116). Eine funktionelle Hepatektomie kann durch komplette Devaskularisierung des Organs erfolgen. Dabei werden nach Anlage eines portocavalen Shunts die A. hepatica und meistens auch der Ductus choledochus und akzesorische Lebergefäße ligiert (75;127). Die klassische Hepatektomie erfolgt durch chirurgische Entfernung der Leber und Überbrückung der großen Gefäße durch einen protocavocavalen Shunt (55). Das klinische Äquivalent entspricht dem schweren Leberschaden nach Lebertrauma oder dem primäre Transplantatversagen nach OLT (116).

1.5.2. Intoxikationsmodelle

Für chemische Modelle werden in der Regel leberspezifische Toxine eingesetzt, welche einen möglichst selektiven Leberschaden verursachen. Dies sind zum einen Giftstoffe, deren akzidentielle oder suizidale Aufnahme auch im klinischen Alltag eine Rolle spielen (Paracetamol, α -Amanitin) (66;87). Wohingegen Paracetamolvergiftungen besonders im angloamerikanischen Raum häufig als Ursache des ALF auftreten, sind Amanitinintoxikationen seltene Erkrankungen, die zumeist auf akzidentielle Pilzingerstion (*Amanita species*) zurückzuführen sind (22;46). Die in unseren Versuchen eingesetzten Amatoxine hemmen dabei nach Aufnahme die RNA-Synthese in eukarioten Zellen insbesondere der Leber aber auch der Tubuluszellen der Niere und führen so zum ALF (114;120). Zum anderen verwendete Toxine sind Galaktosamin, Tetrachlorcholenstoff, Thioacetamid und Azoxymethan. Biologische Giftstoffe sind *Propionibacterium agnes* und das RHDV (rabbit hemorrhagic disease virus), welches ausschließlich bei Hasen eine

Virushepatitis auslöst, die der fulminanten humanen Hepatitis B, C und E gleicht (116).

1.6. Fragestellung

Diese Arbeit befasst sich mit der Frage nach der zytokinvermittelten Immunantwort auf die chirurgische Hepatektomie im Vergleich zum Leberversagen durch die Vergiftung mit Amanitin beim Schwein und dessen Behandlung unter intensivtherapeutischen Bedingungen. Insbesondere die Rolle der Zytokine IL-6 und TNF- α sollen dabei genauer untersucht werden. Aus den perioperativen Verläufen der Serumspiegel dieser Schlüsselproteine soll versucht werden, zwischen der Auslösung eines SIRS beziehungsweise der Vermittlung eines hepatischen Regenerationsreizes zu differenzieren. Darüber hinaus soll die Entwicklung von Temperatur und Leukozyten in Abhängigkeit der Zytokine IL-6 und TNF- α dargestellt und interpretiert werden.

Anhand der gewonnenen Daten sollen folgende Fragen überprüft werden:

- Verlängert, im Vergleich zu bisher publizierten Daten, eine standardisierte Intensivtherapie die Überlebenszeit der Tiere nach Hepatektomie bzw. Amanitinvergiftung?
- Kommt es in den beiden Modellen des ALF zu unterschiedlichen Zytokinverläufen?
- Ist im Hepatektomiemodell trotz vollständiger Leberresektion ein Regenerationsreiz oder ein SIRS nachweisbar?
- Kann aufgrund der Zytokin-, Leukozyten- und Temperaturverläufe zwischen einem SIRS und einem Regenerationsreiz unterschieden werden?
- Kann im Amanitinmodell aus dem Verlauf der Interleukinwerte prädiktiv auf eine Leberregeneration geschlossen werden?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Rechtliche Grundlagen

Die Daten zur vorgelegten Arbeit wurden in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorgaben (§4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998, BGBl. S. 1105) über den Tierschutzbeauftragten der Universität Tübingen an die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen gemeldet und unter Aktenzeichen C11/02 und C 1/05 genehmigt. Die Pflege und Behandlung erfolgte in Übereinstimmung mit den europäischen Tierschutzrichtlinien und unter Aufsicht von Veterinärmedizinern.

2.1.2. Tiere

In die Hepatektomiestudie wurden 20 weibliche Schweine der Gattung Deutsche Landrasse mit einem Gewicht von 30 bis 46 Kilogramm (mittleres Gewicht 34 ± 4 kg) eingeschlossen.

Die Untersuchungen zur Amanitinintoxikation wurden an 8 Schweinen der Deutschen Landrasse (zwei weibliche und sechs männliche, kastriert) mit einem Gewicht von 29 bis 34 kg (mittleres Gewicht 32 ± 2 kg) durchgeführt.

2.1.3. Gewinnung der Untersuchungsmaterialien

Die für diese Arbeit verwendeten Serumproben wurden in regelmäßigen Abständen aus den arteriellen Kathetern der Schweine gewonnen. Den Hepatektomietieren wurde präoperativ eine Probe (prä OP) entnommen. Im weiteren Verlauf wurde direkt nach der Explantation (post OP) und ab 0:00 Uhr des darauf folgenden Tages regelmäßig im Abstand von 8 Stunden um 0:00 Uhr, 8:00 Uhr und 16:00 Uhr die Blutabnahme wiederholt (1. POP 0:00; 1. POP 8:00; 1. POP 16:00; 2. POP 0:00, etc.). Die letzte Blutentnahme erfolgte zum Zeitpunkt des Todes des Tieres. Den Tieren des Intoxikationsmodells wurde vor Vergiftung und anschließend an jedem postoperativen Tag um 8:00 Uhr Proben entnommen. Die Blutproben dienten der Bestimmung der Entzündungsparameter und der labordiagnostischen Untersuchungen. Letztere wurden nach Vorgaben der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen bestimmt und umfassten folgende Parameter:

Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, Kreatinin, Harnstoff, Gesamteiweiß, Albumin, Thrombozyten, INR, PTT, Ammoniak, Gesamtbilirubin, GOT, GPT, LDH, CK und CK-MB. Die Serumproben zur Bestimmung der Entzündungsparameter wurden abzentrifugiert und das Serum in gleichen Teilen zur Konservierung in Eppendorf Cups pipetiert und bei -80 °C tiefgefroren. Die einzelnen Proben wurden am Messtag bei Raumtemperatur aufgetaut.

2.1.4. Interleukin-6 Messung (Hepatektomie)

Zur Interleukin-6 Messung wurden folgende Materialien und Reagenzien eingesetzt:

ELISA-Kit DuoSet[®] ELISA Development System porcine IL-6, R&D Systems, Minneapolis, USA (Catalog Number: DY686)
ELISA-Washer Wellwash 4, Denley Instruments Ltd., Great Britain
ELISA-Reader Medgenix 400 AT, SLT-Labinstruments, Grödig, Österreich
Auswertungsprogramm EASYfit, SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
Waage Sartorius analytic, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
-80°C Gefrierschrank Hera freeze, Heraeus, Hanau, Deutschland
pH-Messgerät inoLab pH Level 2, WTW (Wissenschaftliche Technische Werkstätten), Weilheim, Deutschland
Schüttelgerät MS1 Minishaker, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, USA
Elektrische Pipetierhilfe pipetus akku, Hirschmann
Magnetischer Rührer Unimag ARE, UniEquip, Martinsried, Deutschland
Einmalgefäße (Cups, 1,5 und 2 ml), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalgefäße (Falcon[®] Tubes, 14 ml), Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Bechergläser und Messzylinder der Firma Schott, Deutschland
Mikrotiterplatten Nunc-Immuno[®] Plate, Maxi Sorp[®] Surface, Nalge Nunc International, Dänemark
Pipetten, Eppendorf, Hamburg
1 N Schwefelsäure der Universitätsapotheke Tübingen, Tübingen, Deutschland
Sucrose, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA
BSA (126) Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA
Tween[®] 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat), Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

PBS Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.5. TNF- α Messung (Hepatektomie)

Zur TNF- α Messung wurde verwendet:

ELISA-Kit DuoSet[®] ELISA Development System porcine TNF- α /TNFSF1A, R&D Systems, Minneapolis, USA (Catalog Number: DY690)

ELISA-Washer Wellwash 4, Denley Instruments Ltd., Great Britain

ELISA-Reader Medgenix 400 AT, SLT-Labinstruments, Grödig, Österreich

Auswertungsprogramm EASYfit, SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland

Waage Sartorius analytic, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland

-80°C Gefrierschrank Hera freeze, Heraeus, Hanau, Deutschland

pH-Messgerät inoLab pH Level 2, WTW (Wissenschaftliche Technische Werkstätten), Weilheim, Deutschland

Schüttelgerät MS1 Minishaker, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, USA

Elektrische Pipetierhilfe pipetus akku, Hirschmann

Magnetischer Rührer Unimag ARE, UniEquip, Martinsried, Deutschland

Einmalgefäße (Cups, 1,5 und 2 ml), Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Einmalgefäße (Falcon[®] Tubes, 14 ml), Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA

Bechergläser und Messzylinder der Firma Schott, Deutschland

Mikrotiterplatten Nunc-Immuno[®] Plate, Maxi Sorp[®] Surface, Nalge Nunc International, Dänemark

Pipetten, Eppendorf, Hamburg

1 N Schwefelsäure der Universitätsapotheke Tübingen, Tübingen, Deutschland

Sucrose, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA

BSA (126) Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA

Tween[®] 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat), Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

PBS Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Trizma Base

Normal Goat Serum, Code No. X 0907, Lot 035, DAKO A/S, Glostrup, Dänemark

2.1.6. TNF- α und IL-6 Messung (Intoxikation)

Zur Messung der Zytokine in der Intoxikation-Gruppe wurde verwendet:

FlowCytomix human TH1/Th2 10plex Kit II, Bender MedSystems, Wien, Österreich
ELISA-Reader Medgenix 400 AT, SLT-Labinstruments, Grödig, Österreich
Schüttelgerät MS1 Minishaker, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, USA
Pipetten, Eppendorf, Hamburg
Elektrische Pipetierhilfe pipetus akku, Hirschmann
Bechergläser und Messzylinder der Firma Schott, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Anästhesie

Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Tiere unter standardisierten Laborbedingungen gehalten und einer 24 stündigen Nahrungskarenz unterzogen. Nach intramuskulärer Prämedikation mit Atropin-Sulfat 0,1% (0,05 mg/kg KG; B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), Ketaminhydrochlorid (7 mg/kg KG; Ketamin 10%; Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland), Azaperon (10 mg/kg KG; Stresnil; Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) und Diazepam (1 mg/kg KG; Valium; Hoffmann-La Roche AG, Wyhlen, Deutschland) wurde den Schweinen ein venöser Zugang (98) und ein zentralvenöser Katheter (Cavafix; beide B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) über die Ohrvenen gelegt. Diese Zugänge wurden zur sicheren Aufrechterhaltung der Narkose bis zur Präparation der Halsgefäße benötigt. Anschließend wurden die Tiere mit einem Magilltubus der Größe 8 Ch intubiert und druckkontrolliert beatmet (Galileo Gold; Hamilton Medical AG, Schweiz). Zielwerte der Beatmung waren ein Tidalvolumen von 6-10 ml/kg Körpergewicht bei einer Atemfrequenz von 8-12 Atemzügen pro Minute und ein, nach arteriellem Sauerstoffpartialdruck gesteuerter, inspiratorischer Sauerstoffgehalt. Die Muskelrelaxation in der operativen Studie wurde mit Rocuronium-Bromid (1 mg/kg KG; Esmeron; Organo-Teknika Medizinische Produkte GmbH, Eppelheim, Deutschland) durchgeführt. Die Narkose erfolgte als totale intravenöse Anästhesie mit kontinuierlicher Infusion von Ketaminhydrochlorid (15 mg/kg KG und Stunde), Fentanyl (0,02 mg/kg KG und Stunde; Fentanyl-Janssen; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und Midazolam (0,9 mg/kg KG und Stunde; Dormicum;

Hoffmann-La Roche AG, Wyhlen, Deutschland) ab der Anlage eines sicheren venösen Zuganges bis zum Tod der Tiere. Alle Tiere erhielten präoperativ eine antibiotische Prophylaxe mit 2 g Ceftriaxon (Rocephin, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland). Intra- und postoperative Hypothermie (Körperkerntemperatur unter 35,5 °C) wurde mit Wärmematten und Wärmflaschen behandelt.

2.2.2. Chirurgischer Eingriff

Nach antibiotischer Prophylaxe wurden die Tiere unter sterilen Kautelen operiert. Die Tiere wurden hierzu auf einem OP-Tisch (Eickemeyer, Tuttlingen) mit speziell angefertigtem Aufbau (eigene Herstellung) gelagert. Aus technischen Gründen mussten die Tiere in Rückenlage fixiert werden.

Die anschließende Punktion der Vv. jugulares (Multi-Lumen Central Venous Catheter; Arrow International, Reading, PA, USA) und der A. carotis communis (Leadercath; Vygon, Écouen, France) diente der kontinuierlichen Überwachung, Narkoseführung und der Probenentnahme.

Das Abdomen wurde mittels medianer Laparotomie eröffnet und die Blase zur Überwachung der Urinausscheidung punktiert und katheterisiert (Gentle-Flow; Tyco Healthcare, Tullamore, Ireland). Nach Freipräparieren der Leber und Unterbindung der A. hepatica und des Ductus hepaticus communis, wurde die Portalvene und die infrahepatische V. cava mobilisiert und für die Anastomose mit einer Y-Gefäßprothese (Uni-Graft K DV; ITV, Denkendorf, Deutschland) vorbereitet. Zur Durchführung der suprahepatischen Anastomose wurde linksseitig das Zwerchfell eröffnet. Die Anastomosen wurden End-zu-Seit vernäht, wodurch nur etwa ein Drittel des jeweiligen Gefäßes ausgeklemmt werden musste und somit eine Unterversorgung der abdominalen Organe, ein starker Abfall des Blutdruckes oder eine myokardiale Schädigung durch Reduzierung der Vorlast vermieden werden konnte. Nach Beendigung der Anastomosen wurden die Vv. cavae und die V. portae komplett geklemmt und der Blutfluss über die Gefäßprothese freigegeben. Die Leber wurde en bloc mit der intrahepatischen V. cava inferior resiziert (Abb. 1). Intraoperativ wurde zur Aufrechterhaltung eines adäquaten arteriellen und venösen Mitteldruckes Kochsalzlösung 0,9% (NaCl 0,9%; B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Hydroxyethylstärke 6% (Voluven HES 130/0,4; Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) infundiert. Der intraoperative Blutverlust (zwischen 300 und 700 ml) wurde durch Transfusionen mit porcinen

Erythrozytenkonzentraten (pEK) und porcinen Fresh Frozen Plasma Einheiten (pFFP) ersetzt (eigene Herstellung). Um einen hohen renalen Durchsatz zu erreichen, wurde intraoperativ kontinuierlich Furosemid (bis 20 mg/h; Lasix; Ratiopharm, Ulm, Deutschland) infundiert. Zwerchfell und Abdomen wurden nach Blutstillung verschlossen (54;113).

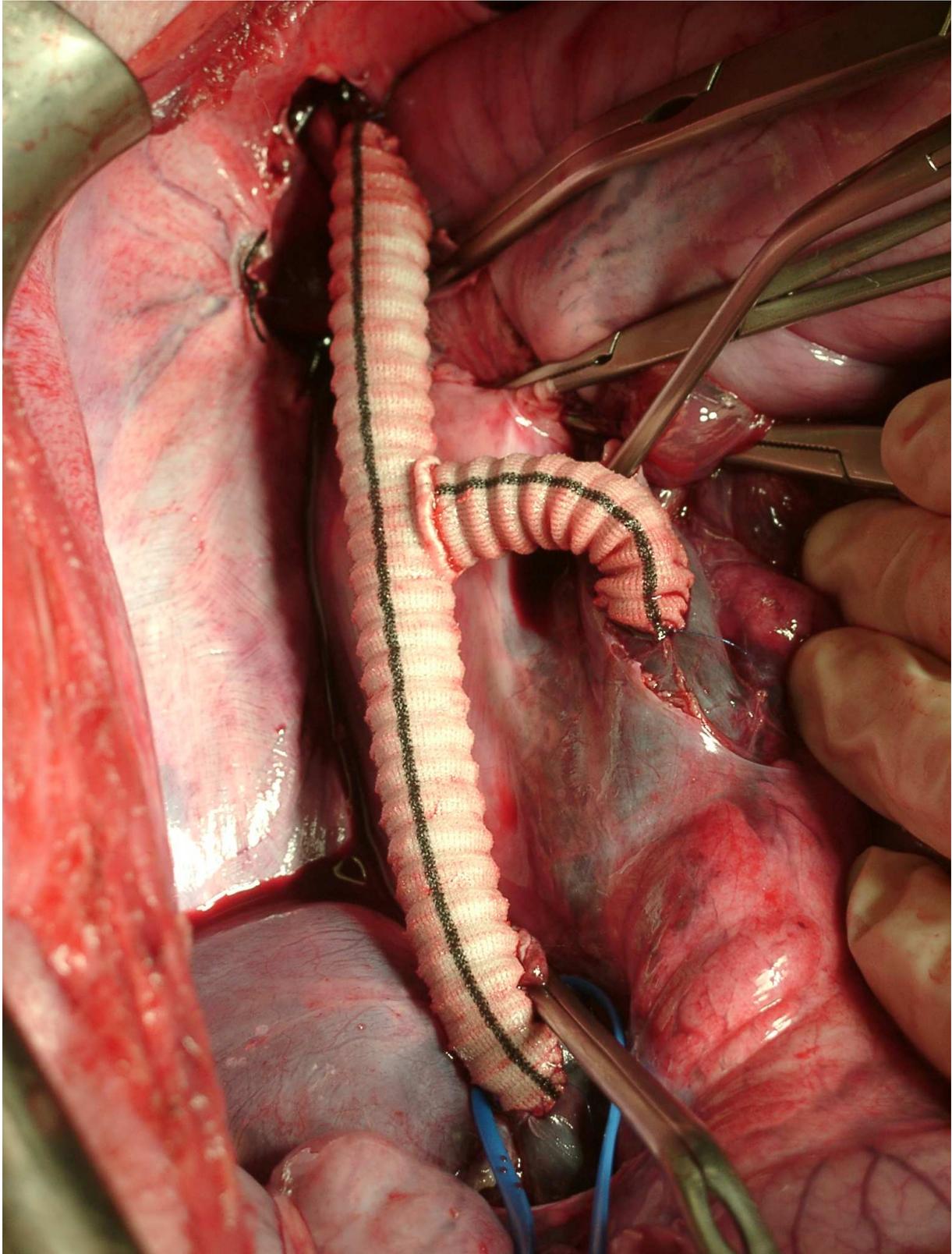


Abb. 2 Portocavocavaler Shunt in situ

2.2.3. Intoxikation

Zur Intoxikation der Tiere mit α -Amanitin wurden diese ebenfalls nach 24 stündiger Nahrungskarenz und antibiotischer Prophylaxe unter intravenös applizierter Anästhesie offen chirurgisch katheterisiert. Katheter wurden in die Vv. jugulares und die A. carotis communis platziert. Diese dienten, ebenso wie in der Hepatektomiegruppe, der kontinuierlichen Überwachung, Narkoseführung und der Gewinnung von Blutproben. Anschließend erfolgte, für die kontinuierliche Überwachung der Urinproduktion, die Laparotomie zur Freilegung und Katheterisierung der Blase. Für die Amanitinapplikation wurde die Vena porta freigelegt und ebenfalls punktiert. Hierüber wurden α -Amanitin (0,15-0,35 mg/kg KG) injiziert. Bei stabilen kardiorespiratorischen Zuständen wurden die Schweine in tiefer Narkose auf die Tierintensivstation verlegt.

Das nach der Vergiftung auftretende Leberversagen wurde als Absinken des Quick-Wertes unter 30% definiert. Nach Eintreten des Leberversagens war die Gabe von pFFPs nur unterhalb eines Quickwertes von 30% erlaubt. Stieg der Quick über diesen Grenzwert und hielt sich dort ohne Substitution für 24 Stunden wurde das ALF als regeneriert betrachtet und das Tier mit einer intravenösen Gabe von T61 (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) getötet.

2.2.4. Intensivtherapie

Die Tiere blieben weiterhin unter Vollnarkose und wurden druckkontrolliert beatmet. Um ausreichende Oxygenierung zu gewährleisten, wurden eine Atemfrequenz von 15-30 Atemzügen pro Minute, Tidalvolumina von 6-12 ml/kg KG und eine FiO_2 von 0,3 bis 1,0 angestrebt. Postoperativ wurden Elektrokardiogramm (EKG), arterieller Mitteldruck (MAP), zentraler Venendruck (ZVD), kapilläre Sauerstoffsättigung, intrakranieller Druck (ICP) und Körperkerntemperatur kontinuierlich bestimmt. Urinausscheidung, Blutgase, Säure-Basen-Haushalt, Hämoglobin, Laktat, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Anionenlücke) und Glukose wurden stündlich bestimmt (ABL 720, Radiometer, Kopenhagen) und bei Bedarf umgehend korrigiert. Zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Perfusionsdrucks wurde Noradrenalin (Arterenol; Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden, Deutschland) in Kombination mit HES, NaCl 0,9% und pFFPs verabreicht. In der Intoxikationsgruppe war vor Erreichen des Leberversagens (Quick-Wert unter 30 %) die Gabe von pFFPs nicht erlaubt. Hämoglobinwerte unter 6 g/dl wurden mit der Gabe von pEKs

therapiert. Der Blutzuckerspiegel wurde mit 20 % Glukose Lösung über 100 mg/dl gehalten. Beim Auftreten einer Niereninsuffizienz erhielten die Tiere Furosemid, um die Diurese so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Zum Erhalt eines hohen postoperativen Umsatzes wurde Furosemid verabreicht. Die präoperativ begonnen antibiotische Prophylaxe (2 g Ceftriaxon) wurde weiterhin täglich verabreicht. Der Tod wurde als Herzstillstand oder Abfall des MAP unter 30 mmHg bei maximaler Intensivtherapie definiert. Postmortal wurden zur Überprüfung der Durchgängigkeit der Gefäßprothesen, zum Ausschluss relevanter Blutungen und zur Qualifizierung und Quantifizierung des Aszites exemplarisch Autopsien einzelner Versuchstiere durchgeführt (113).

2.2.5. Herstellung der Blutprodukte

Alle Spendertiere wurden auf ABO Blutgruppenantigene getestet, um eine ABO Unverträglichkeit auszuschließen. Blut wurde in Standardtransfusionsbeuteln gesammelt (500 ml, Compoflex; Fresenius HemoCare, Bad Homburg, Deutschland) und für 20 Minuten bei 2500 G abzentrifugiert (Heraeus Cryofuge 5500i; Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland). Die Plasmafraktion wurde in separate Beutel gefüllt und bei -80°C schockgefroren. Erythrozyten wurden mit 100 ml SAG-M konserviert und bei 4°C für maximal 7 Tage aufbewahrt. Direkt vor Transfusion wurde ein Kreuztest zur Kompatibilitätsprüfung durchgeführt. Um eine Hämolyse des zu transfundierenden Blutes auszuschließen, wurde eine Probe von einem Milliliter bei 5000 G für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Labofuge 300; ThermoElectron Corporation, Langenselbold, Deutschland) (113).

2.2.6. Messung der IL-6 Konzentrationen (Hepatektomie)

Zur Bestimmung der IL-6 Konzentrationen im Serum wurde das DuoSet ELISA Development System von R&D Systems verwendet. Dabei handelt es sich um ein ELISA-Testkit, das nach dem „Sandwichprinzip“ spezifisch auf natürliches und künstlich hergestelltes porcines IL-6 in Serum oder Kulturmedien reagiert. Das System wurde vom Hersteller gegen hoch angereichertes, künstliches Schweine IL-6 kalibriert. Die Messungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt und ausgewertet. Hierzu wurde das ELISA-Messgerät Medigenix 400 AT der Firma SLT Labinstruments verwendet. Die Standardkurve und die Messwerte wurden anhand des PC Programms EASYfit derselben Firma errechnet. Bei zu hohen optischen

Dichtewerten erfolgte eine schrittweise Verdünnung und erneute Messung der Proben.

2.2.7. Messung der TNF- α Konzentration (Hepatektomie)

Zur Messung der TNF- α Konzentration wurde das DuoSet ELISA Development System für Schweine TNF- α der Firma R&D Systems verwendet. Dieses Kit kann zur Bestimmung von sowohl natürlichem als auch rekombinantem Schweine TNF- α aus Serum oder Zellkulturesuspensionen verwendet werden und wurde vom Hersteller gegen hoch angereichertes, künstliches Schweine TNF- α kalibriert. Die Messung wurde analog der IL-6-Messung nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Auswertung wurde dieselbe Hard- und Software verwendet.

2.2.8. Messung IL-6 und TNF- α (Intoxikation)

Zur Messung der Zytokinkonzentrationen im Vergiftungsmodell wurde das FlowCytomix human TH1/Th2 10plex Kit II verwendet. Dieses System ermöglicht die Messung von bis zu 10 Zytokinen aus einer Probe und in einem Messdurchgang. Nach Herstellerangaben besteht eine 100%ige Kreuzreaktivität zu porcinen Interleukinen. Die Prinzipien der Messung entsprechen denen des solide Phase Sandwich ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay). Im Unterschied zum vorangehend beschriebenen Verfahren werden zwei unterschiedlich große Mikrosphären verwendet, welche fluoreszentes Licht unterschiedlicher Intensität emittieren und so unterschieden werden können. Durch diese Methode ist die Messung von zehn Zytokinen gleichzeitig möglich. Die Lichtemission wird durch die Bestrahlung mit einem Laser ausgelöst und kann im infraroten Bereich gemessen werden. Die Messungen und Berechnungen erfolgten nach Angaben der Hersteller. Die Auswertung erfolgte mit der FlowCytomix Pro Software (Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich).

2.2.9. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm JMP (JMP, Vers. 4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Für die Erstellung von Grafiken wurde das Programm Origin (Origin 7, OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA) verwendet. Solange nicht anders beschrieben, sind die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Der statistische Vergleich kontinuierlicher Messwerte wurde mit dem Studentschen T-Test durchgeführt. Zwei verbundene Stichproben wurden anhand des nicht-parametrischen Rangsummentests nach Wilcoxon verglichen. In beiden Fällen wurde ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Hepatektomie

3.1.1. Überlebenszeit

In unserem Modell der Hepatektomie überlebten die Tiere im Maximum 85 Stunden bei einer mittleren Überlebenszeit von 50 ± 20 Stunden. Der Zeitpunkt der Hepatektomie wurde als Beginn des Leberversagens definiert. Der Tod der Tiere trat in einem Zeitintervall von maximal 8 Stunden nach der letzten Blutentnahme ein. Zur Vereinfachung wurde aus den Exitusproben ein mittlerer Wert bestimmt und dieser in den Grafiken zu einem virtuellen Zeitpunkt am Ende des Untersuchungszeitraumes dargestellt.

3.1.2. IL-6

Die Messungen der Interleukine zeigten bei den Tieren des Hepatektomiemodells präoperativ (prä OP) IL-6 Werte von 81 ± 91 pg/ml. Nach Hepatektomie zeigte sich ein erster allerdings nicht signifikanter Konzentrationsanstieg, mit einem Maximum am 1. POP 0:00 von 698 ± 480 pg/ml. Anschließend verblieben die Werte auf einem Plateau um 300 pg/ml. Ein zweiter kurzer Peak zeigte sich am 3. POP 8:00 mit 781 ± 498 pg/ml. Am deutlichsten stiegen die IL-6 Werte zum Zeitpunkt des Todes der Tiere von 315 ± 305 auf 2455 ± 2961 pg/ml an (Abb. 3).

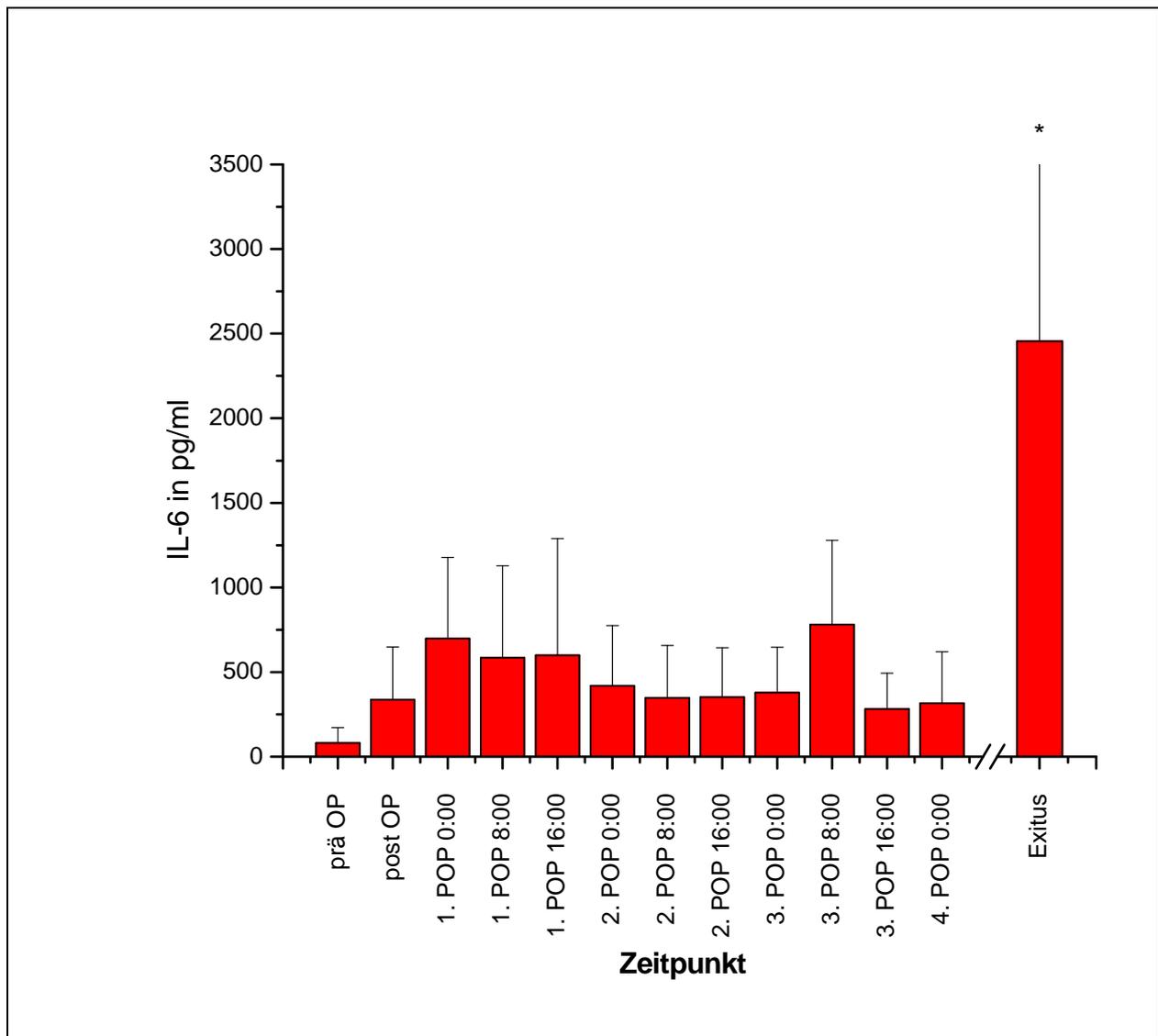


Abb. 3 Gemittelte IL-6-Werte der hepatektomierten Tiere

3.1.3. TNF- α

TNF- α Werte konnten nur bei drei Tieren (S 28, S 36 und S 38) zum Exituszeitpunkt gemessen werden. Die Ergebnisse der anderen gemessenen Proben lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Auf eine grafische Darstellung wurde in diesem Fall verzichtet.

3.1.4. Leukozyten

Die in Abb. 4 dargestellten mittleren Leukozytenzahlen lagen prä OP bei 18872 ± 5206 / μ l. Postoperativ fielen die Leukozytenwerte kurzzeitig auf 14044 ± 4243 / μ l, um dann signifikant zum 1. POP 0:00 auf 25911 ± 9400 / μ l zu steigen ($p < 0,05$). Die Werte hielten sich anschließend ähnlich der Interleukinwerte auf einem Plateau um

25000 / μ l. Es ließen sich keine weiteren Anstiege nachweisen. Im Gegenteil fielen die Werte zum Exituszeitpunkt auf 10637 ± 8125 / μ l ab.

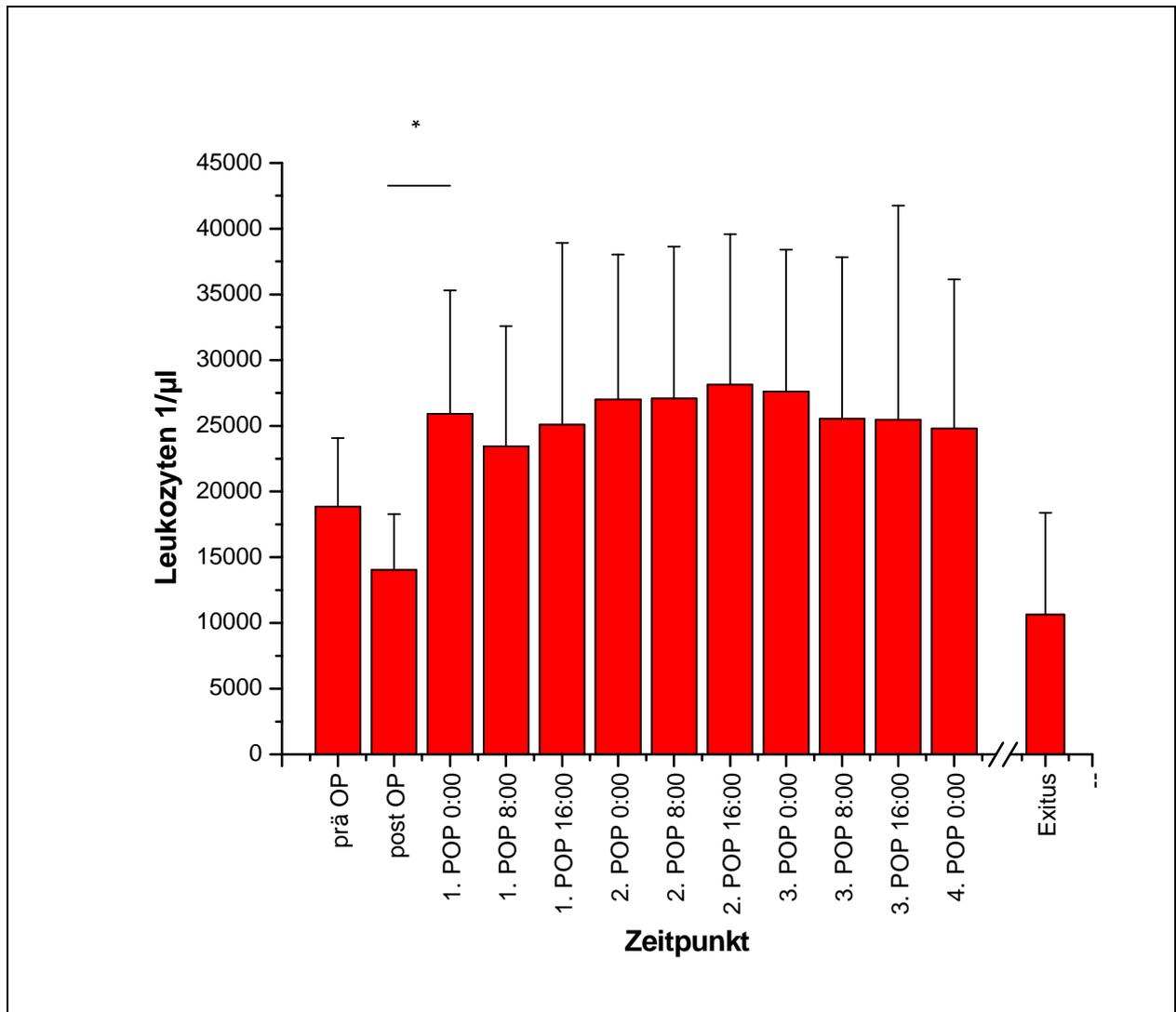


Abb. 4 Gemittelte Leukozytenwerte der hepatektomierten Tiere (* / entspricht einer signifikanten Wertänderung zum Vorwert)

3.1.5. Körperkerntemperatur

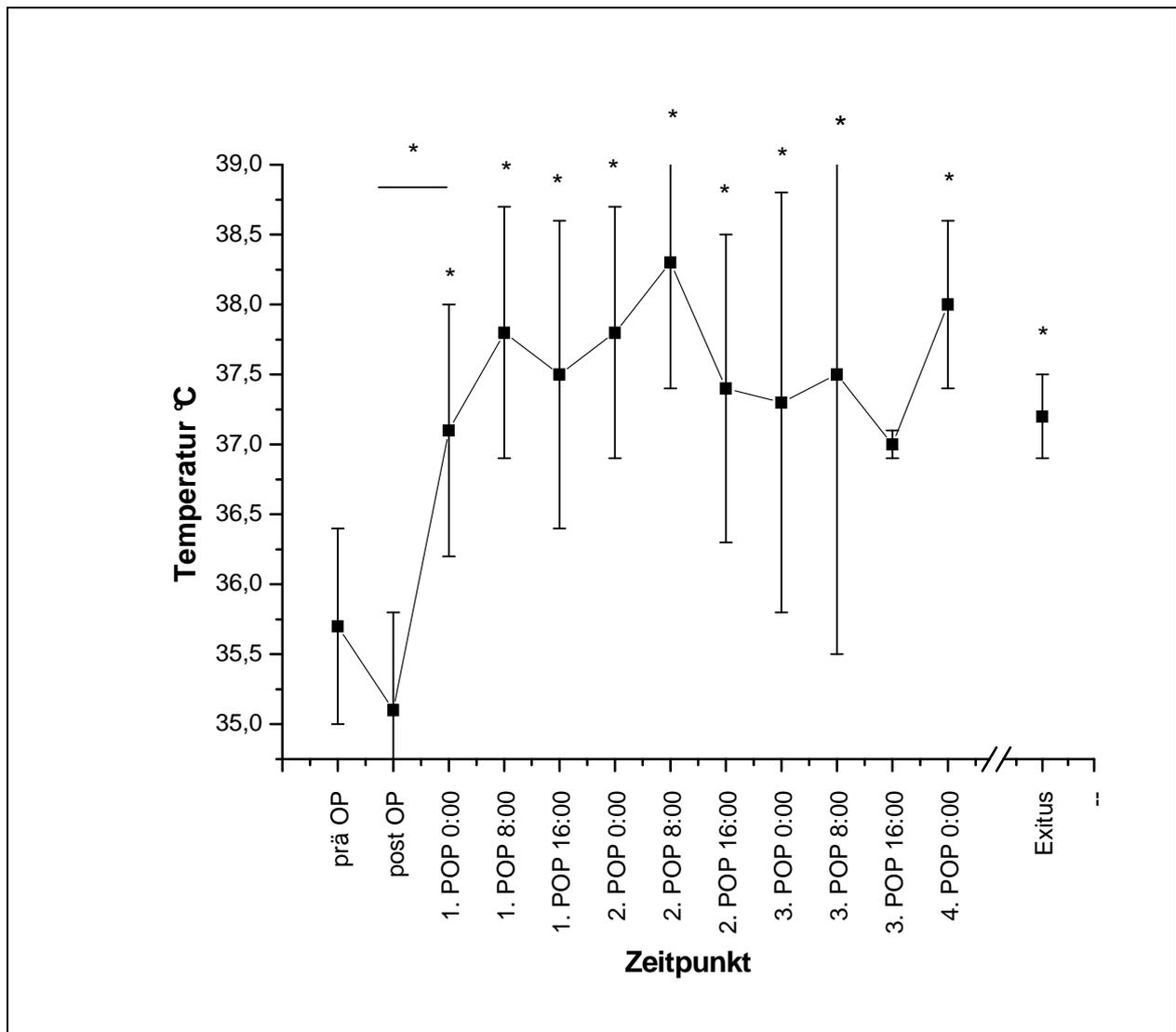


Abb. 5 Gemittelter Verlauf der Körperkerntemperatur der hepatektomierten Schweine (* signifikante Änderung zum präoperativen Wert, */ signifikante Veränderung zum Vorwert)

Die rektal gemessene Körperkerntemperatur wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Die gemittelten Daten wurden aus den jeweiligen Werten zum Zeitpunkt der Blutentnahmen bestimmt. Wie in Abb. 5 dargestellt, zeigte sich bei einer gemittelten Ausgangstemperatur von $35,7 \pm 0,7$ °C ein intraoperativer Abfall der Temperatur auf $35,1 \pm 0,7$ °C. Am ersten postoperativen Tag kam es zu einem signifikanten Temperaturanstieg von $35,1 \pm 0,7$ auf $37,1 \pm 0,9$ °C ($p < 0,05$). Bis zum Tod der Tiere blieb die Temperatur auf einem konstanten Niveau.

3.2. Intoxikation

Die Tiere des Intoxikationsmodells entwickelten nach 42 ± 9 Stunden ein ALF. Bei 50% der Tiere kam es zu einer Regeneration der Leberfunktion (REG). Diese Tiere wurden im Schnitt nach 147 ± 19 Stunden getötet. Die Überlebenszeit der nicht regenerierenden Tiere (NOREG) lag bei $105,4 \pm 46,1$ Stunden. Das therapeutische Fenster (Zeit im ALF) betrug im Mittel 59 ± 32 Stunden. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde im Intoxikationsmodell zwischen den regenerierenden Tieren (REG) und den nichtregenerierenden Tieren (NOREG) unterschieden. Die Zytokinbestimmungen erfolgten aus den täglich entnommenen Proben. Temperatur und Leukozyten wurden kontinuierlich aufgezeichnet und im bekannten acht Stunden Rhythmus ausgewertet. Vergleichbar zu den Hepatektomietieren ist der Exituszeitpunkt als virtuell anzusehen. Zur Vereinfachung der Nomenklatur wurde der Terminus POP zur Bezeichnung der Blutproben auch im Vergiftungsmodell beibehalten.

3.2.1. IL-6

Die Tiere der Regenerationsgruppe starteten mit einem IL-6 Wert von 1294 ± 1674 pg/ml. Im Verlauf zeigte sich nach einem Abfall des Zytokinspiegels zum 4. POP 8:00 auf 275 ± 306 pg/ml ein signifikanter Anstieg der Werte vom 5. POP auf den 6. POP 8:00 von 1197 ± 1703 auf 3250 ± 1215 pg/ml ($p < 0,05$) (Abb. 6).

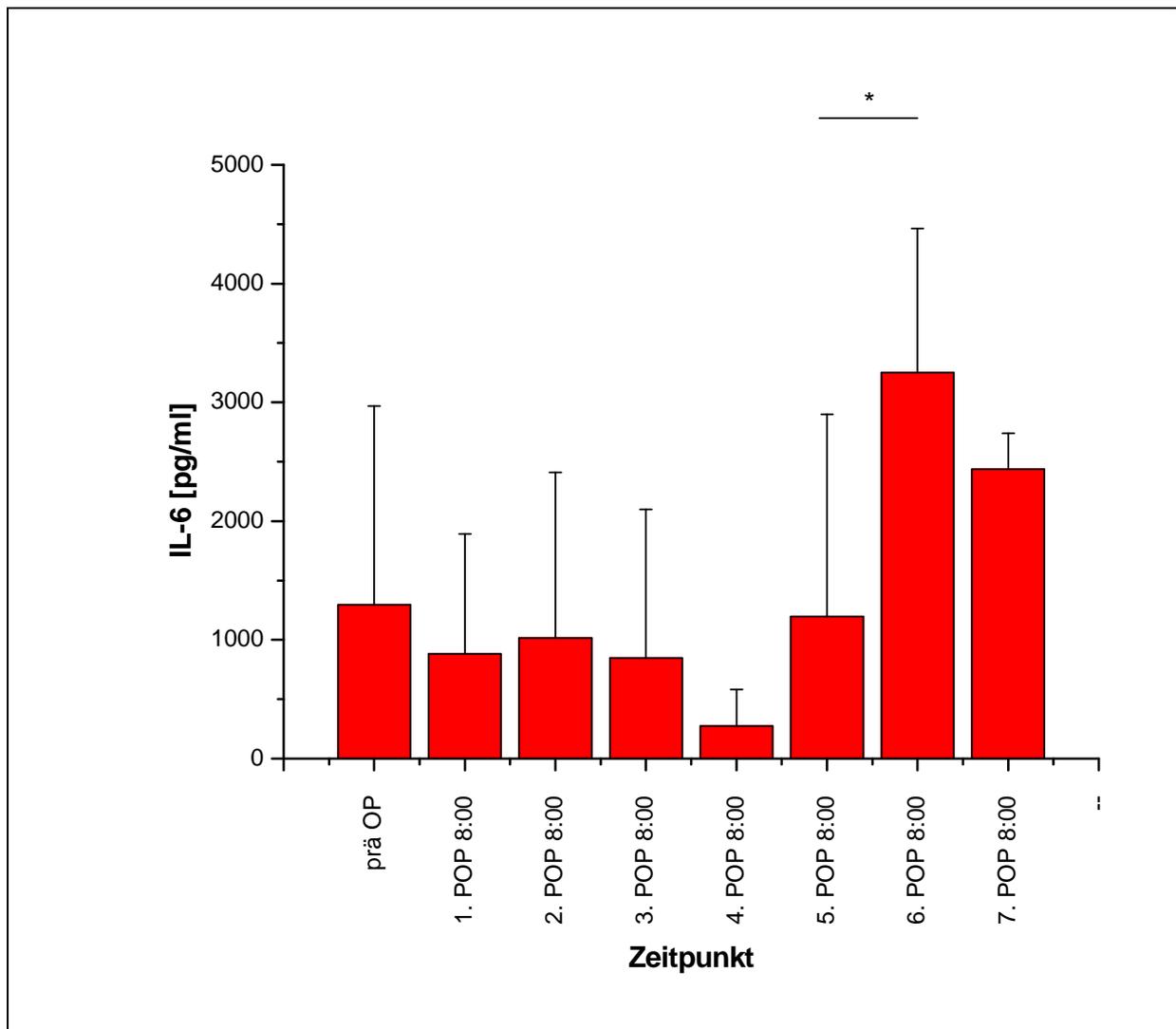


Abb. 6 Gemittelte IL-6 Werte der regenerierenden Amanitintiere (REG; */ entspricht einer signifikanten Wertänderung zum Vorwert)

Die IL-6 Werte der Nichtregenerationsgruppe (Abb. 7) lagen prä OP bei 1976 ± 2474 pg/ml und damit über den Werten der Regenerationstiere von 1294 ± 1674 pg/ml (Abb. 8). Nach fast unverändertem postoperativem Verlauf fielen die IL-6 Werte vom 2. POP auf den 3. POP 8:00 von 2089 ± 1618 auf 128 ± 123 pg/ml. Zwischen diesen Zeitpunkten verstarb eines der Versuchstiere. Im Weiteren stiegen die IL-6 Werte noch einmal zum 7. POP 8:00 auf 923 pg/ml an. Zu diesem Zeitpunkt lebte nur noch ein Versuchstier.

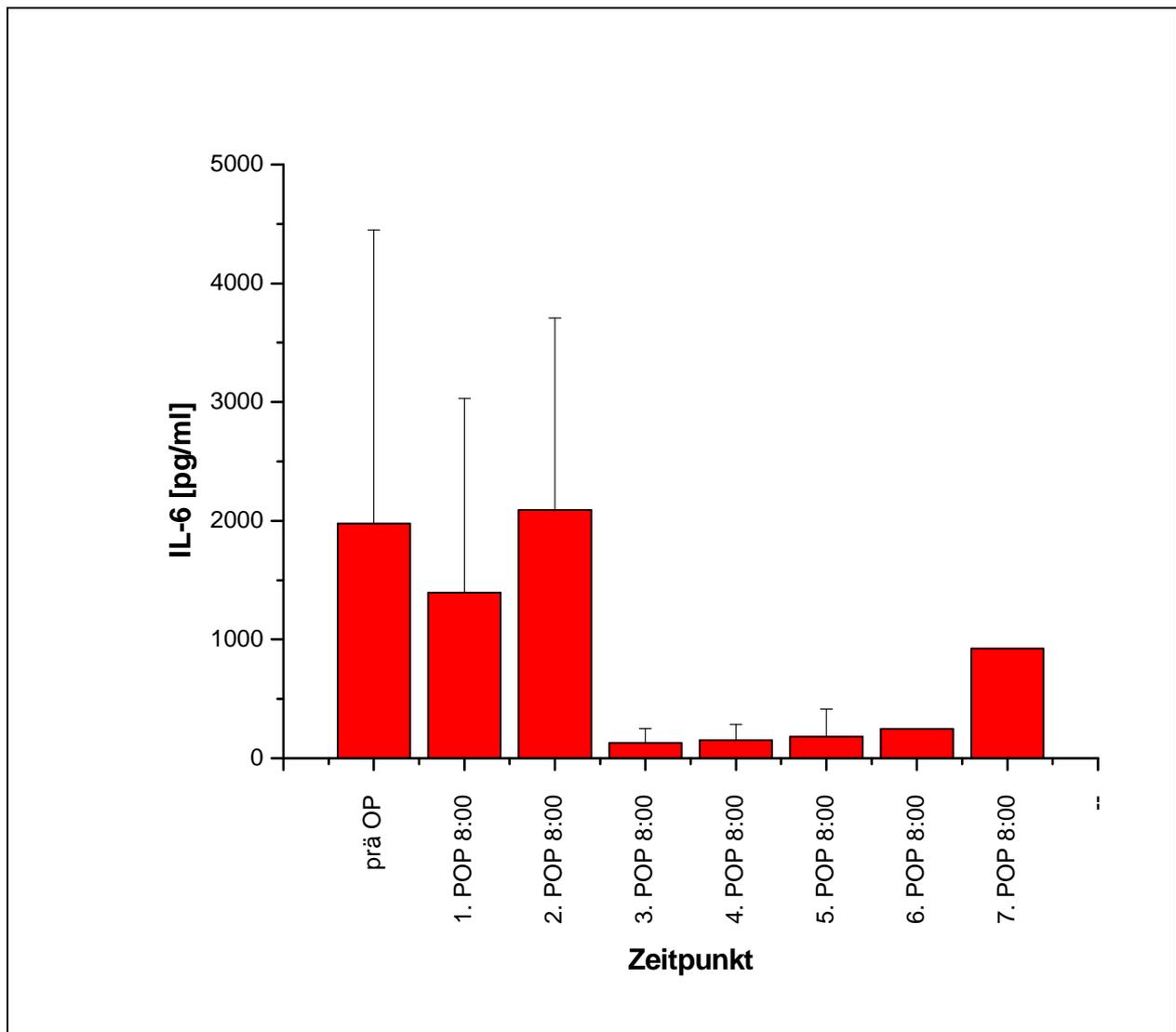


Abb. 7 Gemittelte IL-6 Werte der nicht regenerierenden Amanitintiere (NOREG)

Im direkten Vergleich der beiden Gruppen (Abb. 8) zeigt sich das höhere Ausgangsniveau der IL-6 Spiegel in der Nichtregenerationsgruppe. An den letzten beiden Versuchstagen (6. POP und 7. POP) lebte in der NOREG Gruppe lediglich ein Tier, weshalb der Unterschied der beiden Gruppen statistisch nicht auswertbar war.

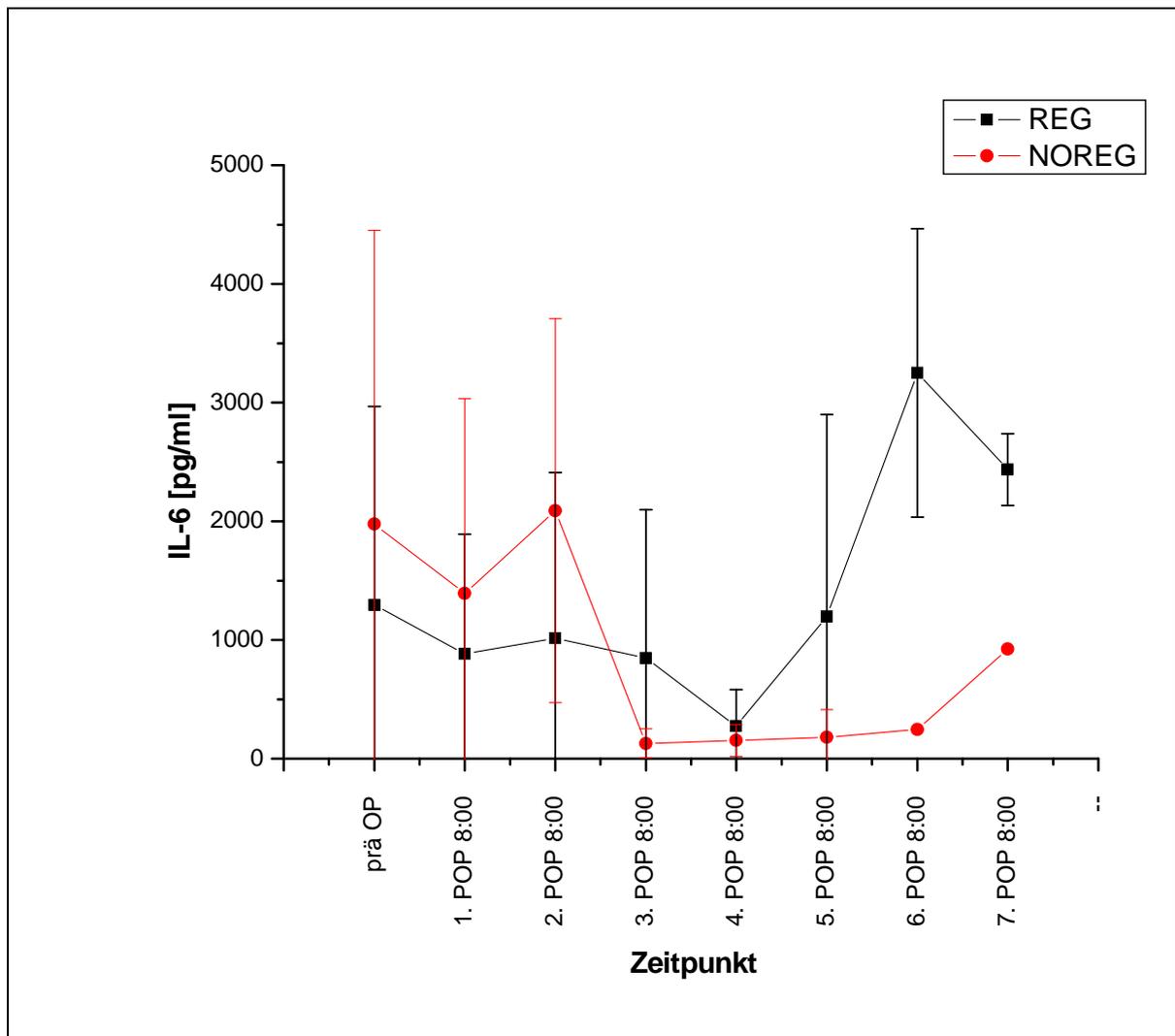


Abb. 8 Vergleich der IL-6 Werte der Intoxikationsgruppen Regeneration (REG) und Nichtregeneration (NOREG)

3.2.2. TNF- α

Beide Gruppen gehen mit vergleichbaren TNF- α Werten in den Versuch (REG 1611 ± 715 pg/ml vs. NOGEG 1818 ± 1007 pg/ml, $p=1$). Nach einem nahezu parallelen Verlauf mit fallenden TNF- α Werten über den 1. POP und 2. POP steigen die Werte der NOREG Gruppe ab dem 2. POP wieder an. Dieser Anstieg hält bis zum 4. POP an. Anschließend fallen die Werte dieser Gruppe bis an die Nachweisgrenze und steigen bis zum Tod der Tiere nicht mehr an, was sich aufgrund der geringen Fallzahl ab diesem Zeitpunkt allerdings als statistisch nicht relevant erweist (5. POP $n=2$; 6. POP $n=1$). Der postinterventionelle Abfall der Werte in der Regenerationsgruppe setzt sich bis zum 4. POP 8:00 fort. Danach steigen die TNF- α Werte zwischen dem 4. und 6. POP wieder an (387 ± 452 vs. 1501 ± 311 , $p>0,05$) (Abb. 9).

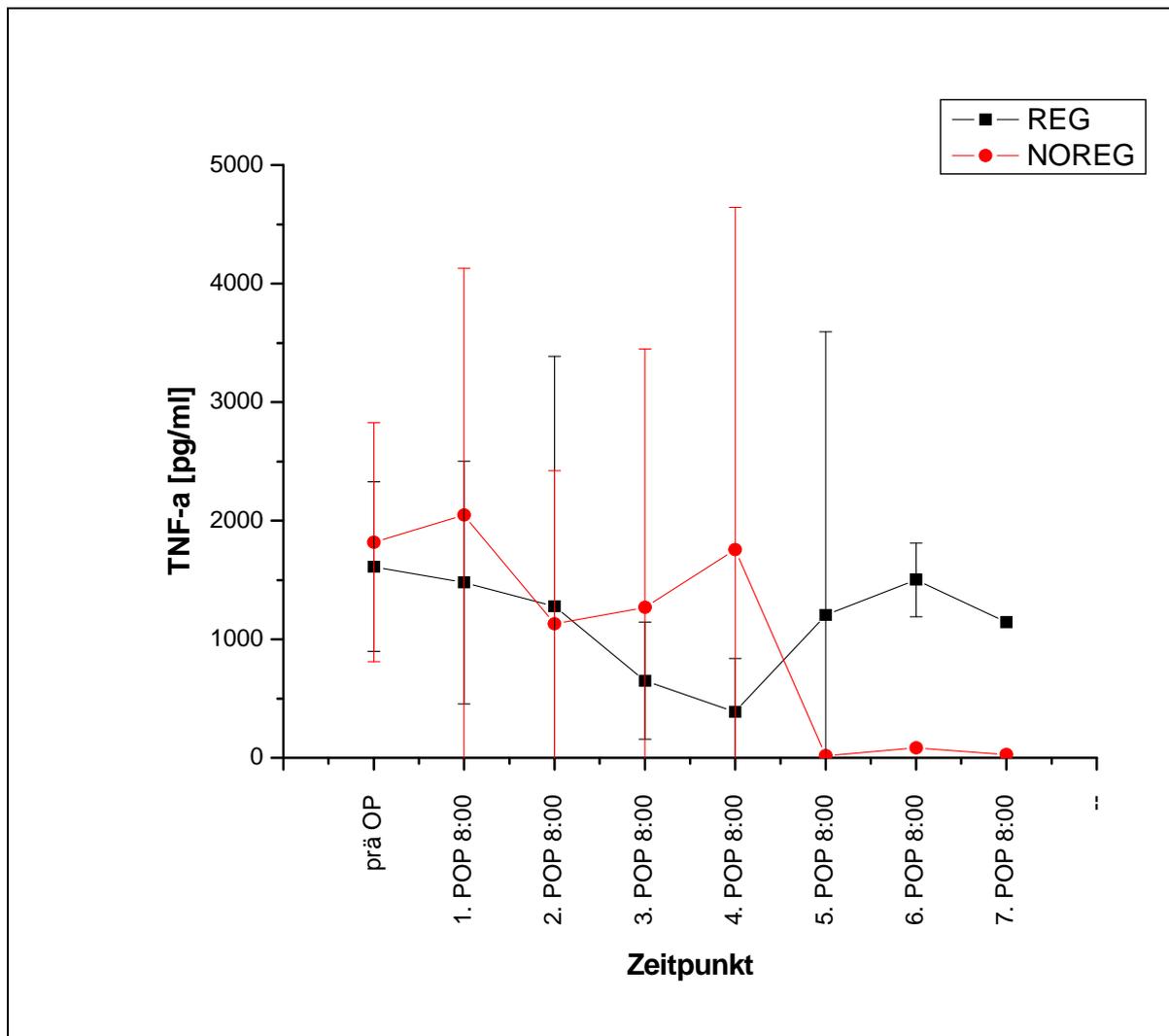


Abb. 9 Vergleich der TNF- α Werte der Intoxikationsgruppen Regeneration (REG) und Nichtregeneration (NOREG)

3.2.3. Leukozyten

In der Nichtregenerationsgruppe zeigten sich präoperativ bereits signifikant höhere Leukozytenwerte (20250 ± 3210 vs. 12255 ± 2201 / μ l, $p=0,021$). Im Verlauf des 1. POP stiegen in beiden Gruppen die Leukozytenwerte an. Die Werte der Tiere der NOREG Gruppe blieben dabei signifikant über den Werten der REG Gruppe (1. POP 8:00: 32780 ± 9691 vs. 20908 ± 5158 / μ l, $p=0,04$; 1. POP 16:00: 37690 ± 8784 vs. 21963 ± 1810 / μ l, $p=0,02$; 3. POP 0:00: 32110 ± 9257 vs. 19075 ± 1623 / μ g, $p=0,03$). Erst zum 4. POP näherten sich die Leukozytenwerte an und blieben im Verlauf der nächsten zwei Tage nahezu parallel. Am 7. POP kam es in der NOREG Gruppe wieder zu einem deutlichen Anstieg der Leukozytenwerte, wobei die Messungen in der REG Gruppe abfielen. Die Anzahl der verbliebenen Versuchstiere in der NOREG

Gruppe ab dem sechsten Tag (n=1) erlaubten keine statistische Aussage zu den Werten in diesem Zeitraum (Abb. 10).

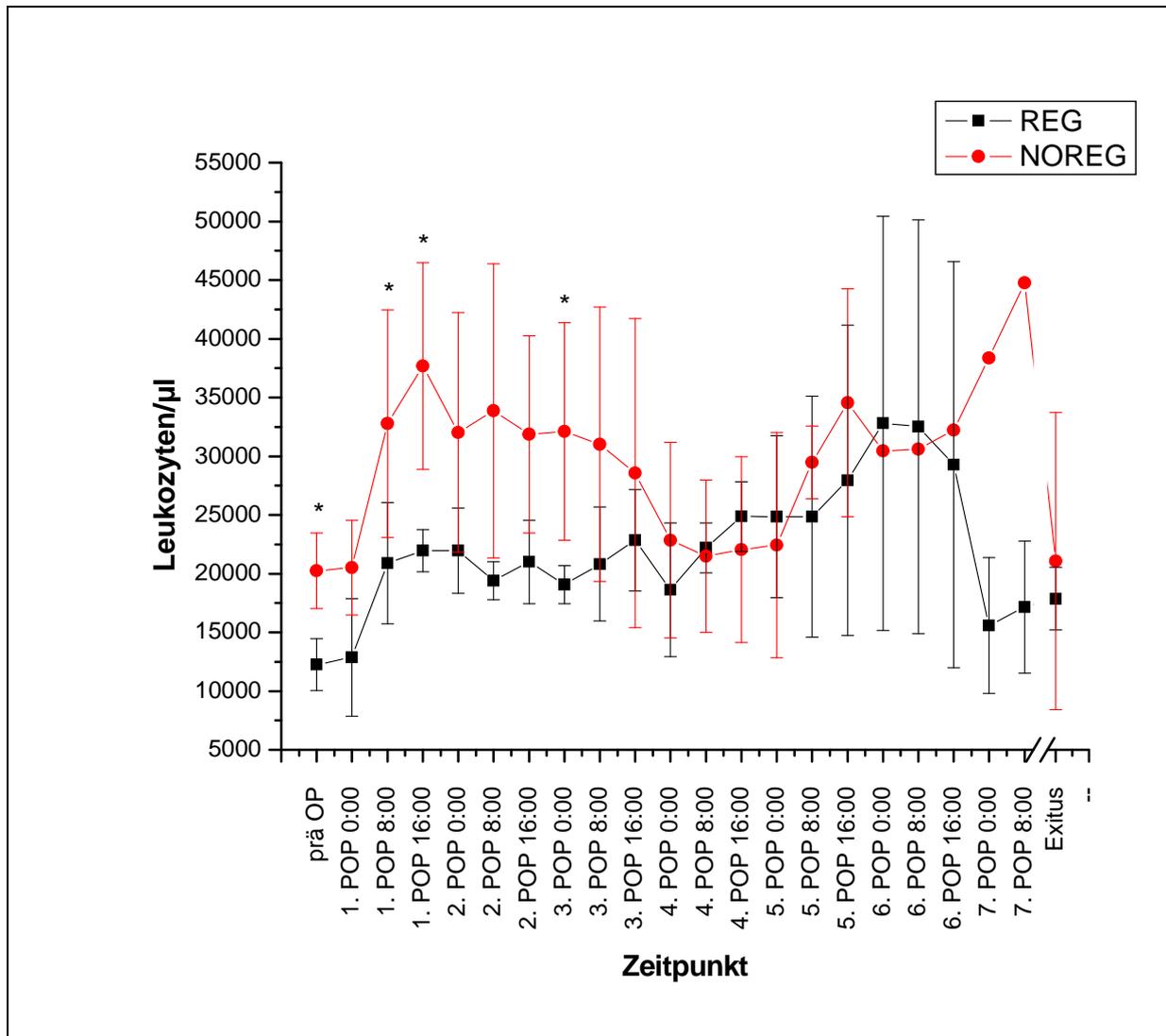


Abb. 10 Vergleich der Leukozytenwerte der Intoxikationsgruppen Regeneration (REG) und Nichtregeneration (NOREG) (* signifikanter Unterschied der beiden Gruppen)

3.2.4. Temperatur

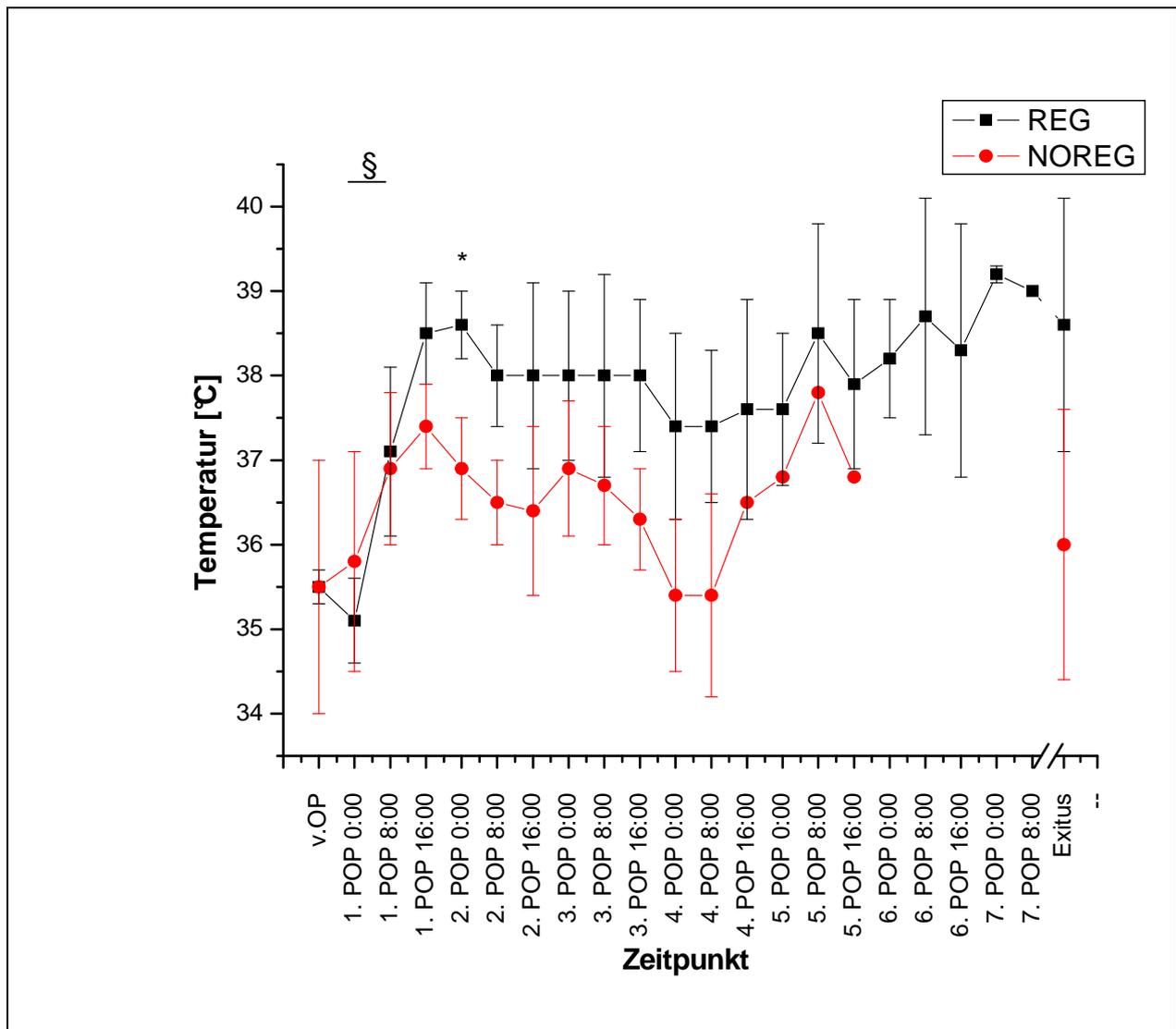


Abb. 11 Vergleich der Temperaturwerte der Intoxikationsgruppen Regeneration (REG) und Nichtregeneration (NOREG) (* signifikanter Unterschied der beiden Gruppen, §/ signifikanter Veränderung zum Vorwert in der REG Gruppe)

Beide Gruppen zeigen eine vergleichbare Ausgangstemperatur von $35,5 \pm 0,3$ °C (REG) und $36 \pm 1,8$ °C (REG vs. NOREG, $p=0,5$). Am 1. POP steigt in beiden Gruppen die Temperatur an, wobei dieser Anstieg nur in der REG Gruppe signifikant ist (1. POP 0:00 $35,1 \pm 0,7$ °C vs. 1. POP 8:00 $37,1 \pm 1,1$ °C, $p<0,05$). Ab dem 1. POP 8:00 zeigt sich die Temperatur in der REG Gruppe durchweg und zum Teil signifikant höher als in der NOREG Gruppe (2. POP 0:00: $38,6 \pm 0,5$ vs. $36,9 \pm 0,7$ °C, $p=0,03$). Am Ende der Überlebenszeit zeigt sich in beiden Gruppen kein relevanter Abfall der Temperatur (Abb. 11).

4. Diskussion

Die vorgelegte Arbeit untersucht den Verlauf der Zytokine TNF- α und IL-6 während des ALF. Hierzu wurden Tiermodelle der Hepatektomie und Amanitinvergiftung entwickelt, die diese Zytokinverläufe verglichen und die Ergebnisse in Relation zum Verlauf der Leukozytenwerte und der Temperatur interpretiert.

Da das Wissen um das ALF immer noch unvollständig ist und wissenschaftliche Untersuchungen zu neu entwickelten Therapieverfahren an betroffenen Patienten nur schwer durchführbar sind, spielen Tiermodelle in der Forschung um das ALF weiterhin eine entscheidende Rolle (116). Die in dieser Arbeit entwickelten Tiermodelle zum Leberversagen zeigen, wie alle bisher publizierten Modelle, spezifische Vor- aber auch Nachteile. Als Versuchstier wurde das Schwein gewählt, da es auf Grund seiner Größe die Möglichkeit bietet, in adäquatem Maße Blut- und Gewebeprobe zu entnehmen. Zudem sollten ALF Modelle entwickelt werden, an denen auch Therapieverfahren getestet werden können. Hierzu bietet die Größe des gewählten Versuchstieres Schwein die Möglichkeiten, diese Verfahren unter klinisch relevanten Bedingungen zu testen. Im Gegensatz zu Versuchen mit Nagern bedürfen Studien an Schweinen einen höheren Einsatz von Ressourcen und finanziellen Mitteln und stellen, insbesondere bei der Gewinnung von Blutprodukten (pEK, pFFP) für eine adäquate Substitutionstherapie, höhere logistische Anforderungen.

Das Hepatektomiemodell zeichnet sich durch eine gute Reproduzierbarkeit und ein ausreichendes Zeitintervall für therapeutische Interventionen aus. Das ALF tritt sofort mit Entfernung des Organs auf und muss nicht anhand von Laborwerte definiert werden. Der Tod der Tiere ist eine unmittelbare Folge des ALF und seiner konsekutiven Auswirkungen auf andere Organsysteme. Dieses Modell ist somit ideal, um Leberersatzverfahren auf ihre Detoxifikationsleistung hin zu prüfen. Eine Auswirkung auf die Gesamtüberlebenszeit lässt sich nicht testen, da eine Reversibilität des ALV nach Hepatektomie ausgeschlossen ist. Ebenfalls nachteilig wird von manchen Autoren das Fehlen von Restlebergewebe und dessen Ausschüttung von Toxinen und Entzündungsmediatoren gesehen, da diesen Faktoren eine Rolle im Pathomechanismus des ALF zugeschrieben wird (116).

Das Schweinmodell der Amanitinvergiftung entspricht einem, wenn auch selten auftretenden, klinischen Bild des ALF. Wie die Hepatektomie verfügt dieses Modell über ein vergleichbar großes Therapieintervall und die Möglichkeit, dass die Tiere am ALF und seinen konsekutiven Komplikationen versterben. Aufgrund der in situ

verbleibenden Restlebermasse können die Tiere nach Entwicklung eines ALF wieder regenerieren. Dies ermöglicht einen Vergleich zwischen regenerierenden und versterbenden Tieren. Für ein wissenschaftlich anwendbares Intoxikationsmodell sollte die Letalität bei 100% liegen und eine Regeneration mit Überleben nur unter Einsatz einer entsprechenden Therapie stattfinden. Im hier gezeigten Modell regenerierten ohne Leberersatztherapie bereits 50 % der Tiere, womit die Interpretationsmöglichkeit bei Austestung von Therapieverfahren erschwert sein könnte. Das Leberversagen tritt erst 42 ± 9 Stunden nach Intoxikation ein. In diesem Zeitraum können Komplikationen wie Infektionen auftreten, die unabhängig vom ALF das Outcome negativ beeinflussen. Verglichen mit dem Hepatektomiemodell hat das Intoxikationsmodell den Vorteil, dass Toxine und Entzündungsparameter aus der Leber zirkulieren können und das Amanitinmodell, auf diese Faktoren bezogen, eher dem klinischen Bild des ALF entspricht. Wir haben neben dem Hepatektomiemodell das Amanitinmodell gewählt, um feststellen zu können, ob sich dieser spezifische Unterschied im Zytokinverlauf widerspiegelt.

Bisher publizierte Schweinemodelle des ALF erreichten mit und ohne Einsatz von Leberersatzverfahren meist Überlebenszeiten zwischen 10-48 Stunden (19;32;34;49;63;65;79;95;97). Dabei legen Studien selten Wert auf eine dem humanen Standard entsprechende Intensivtherapie. Manche Gruppen verzichteten postoperativ vollständig auf Narkose und künstliche Beatmung (19;34;49;65;107), beschränken die Therapie auf Kontrolle und Korrektur des Glukose- und Elektrolythaushaltes (61;76) oder beeinflussen den postoperativen Verlauf überhaupt nicht (25;41). Die Gabe von Blutprodukten in Studien zum ALF stellt eine Ausnahme dar (34;42). Die Gründe für die Zurückhaltung in der postoperativen Therapie werden meist mit der besseren Beurteilbarkeit von Leberersatzverfahren durch eine möglichst geringe Beeinflussung des natürlichen Verlaufs des ALF begründet. Die Tiere in unserer Studie wurden angelehnt an die Standards der humanen Intensivtherapie behandelt und über den gesamten Versuchszeitraum in Narkose gehalten. Damit wurden Vorgaben zum Tierschutz entsprochen und darüber hinaus sind wir der Ansicht, dass nur eine entsprechend standardisierte und der humanen Intensivbehandlung angepasste Therapie den tatsächlichen klinischen Verlauf der Patienten mit ALF abbilden kann. Leberersatzverfahren müssen sich in diesem Setting bewähren, um einen tatsächlichen klinischen Benefit belegen zu können. Entsprechend der Erwartungen konnte in unserer Studie die Überlebenszeit der

Hepatektomietiere auf ein Maximum von 89 Stunden bei einer mittleren Überlebenszeit von 50 ± 20 Stunden verlängert werden. Die Überlebenszeit der α -Amanitintiere lag noch deutlich über den Zeiten der Hepatektomietiere. Vergleichbare Überlebenszeiten sind bislang nicht publiziert. Diese Tiere benötigten allerdings durchschnittlich 42 ± 9 Stunden zur Entwicklung eines Leberversagens.

Messungen von Zytokinen können vielen Störfaktoren unterliegen. Insbesondere die Variabilität unter den auf dem Markt befindlichen Test-Kits erschwert die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen. Zur Messung der Zytokine wurde ein humanes Testsystem verwendet, das laut Hersteller zu 100% mit porcinen Zytokinen kreuzreagiert. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Spezifität dieses Systems, im Vergleich zu Systemen mit schweinespezifischen Antikörpern, schwächer einzustufen ist. Da bei den Messungen im Hepatektomiemodell keine Zytokine nachgewiesen werden konnten, wurden die Zytokinmessungen (IL-6 und TNF- α) an einem System wiederholt, welches vom Hersteller gegen hoch angereichertes Schweinezytokin kalibriert wurde. Die Ergebnisse können somit als valide angesehen werden.

Untersuchungen zu Zytokinen am Tiermodell des ALF waren bisher häufig auf Nagetiere wie Ratten und Mäuse beschränkt. Zur Induktion des Leberversagens wurde meist die PH eingesetzt (56). Diese Arbeitsgruppen fokussierten sich zumeist auf die Rolle der Interleukine im Rahmen der Leberregeneration während eines ALF und stellten bei Ihren Untersuchungen weniger den Aspekt einer systemischen Inflammation in den Vordergrund. Bei Patienten im akuten Leberversagen ist aber bekannt, dass sie auf Grund diverser immunologischer Defekte deutlich anfälliger für Infektionen sind. In der Literatur sind Infektionshäufigkeiten zwischen 50 und 90% beschrieben (7;90;91;119). Infektionen treten im Median 2-5 Tage nach Hospitalisierung auf (7) und sind weiterhin die Haupttodesursache für Patienten mit ALF (7). Dabei ist die Diagnose eines SIRS bzw. einer Sepsis gerade bei diesen Patienten schwierig zu stellen. Etwa ein Drittel der Patienten reagiert beispielsweise trotz Infektion nicht mit einer Veränderung der Körpertemperatur auf über 38 oder unter 36 °C (90). Darüber hinaus gleichen sich die klinischen Bilder des septischen Schocks und des ALF. Essentieller Bestandteil beider Syndrome ist die Entwicklung eines SIRS mit sich daraus entwickelnder systemischer Vasodilatation, zirkulatorischer Dysfunktion, und refraktärem Multiorganversagen (7). Bei den

Normalwerten der für die Diagnose SIRS wichtigen Kriterien Leukozyten und Körpertemperatur unterscheiden sich Schweine und Menschen. Der in der Literatur angegebene Referenzwert für Leukozyten beim Schwein wird zwischen 11000 und 22000 / μ l angegeben (10). Für die Diagnose des porcinen SIRS müssen somit andere Kriterien gelten als beim Menschen. Neben den Absolutwerten kann beispielsweise auch die Größe des Abfalls bzw. Anstiegs der Leukozytenwerte herangezogen werden. Wie oben beschrieben treten klassische Temperaturveränderungen ($<36^\circ$ oder $>38^\circ \text{C}$) beim ALF nicht zwingend auf. Darüber hinaus werden Normalwerte für Schweine in der Literatur mit $38,5^\circ$ bis $39,5^\circ \text{C}$ angegeben (10). Für die Verwertung der Temperatur in unserem Modell gelten darüber hinaus gewisse Einschränkungen, da perioperativ durch aktive Wärmung in den natürlichen Temperaturverlauf eingegriffen wurde. Ein prä- und intraoperatives Abkühlen der sedierten Tiere aufgrund des operativen Eingriffs auf Temperaturen zwischen 35° und 36°C , ließ sich nicht vermeiden.

Unsere Daten der Hepatektomietiere zeigen zwei deutliche Anstiege im IL-6 Verlauf, von welchen der erste am 1. POP direkt nach Hepatektomie erfolgt und mit einem parallelen, signifikanten Anstieg von Leukozyten und Temperatur einhergeht. Ein TNF- α Anstieg lässt sich nicht nachweisen. Ein zweiter IL-6 Anstieg lässt sich am Exituszeitpunkt darstellen. TNF- α ist in der Exitusprobe nur bei drei Schweinen messbar. Dieser Interleukinanstieg geht mit einem gleichzeitigen Leukozytenabfall um über 50% einher, während die Temperatur konstant bleibt. Da die Tiere im Vollbild eines ALF unter Umständen keine Temperaturveränderungen aufweisen und zudem die zunehmende Menge an Infusionen ab Beginn des Multiorganversagens einen etwaigen Temperaturanstieg maskieren kann, werten wir diese Exitusmesswerte als Kriterien für ein SIRS, vermutlich im Rahmen eines septischen Geschehens.

Die Ergebnisse der postoperativen Zytokinmessungen stehen im Einklang mit Daten von Akerman (2) und Enayati (21). Die Arbeitsgruppe um Akerman (2) konnte bei Ratten nach 70%iger partieller Hepatektomie (PH) im Serum keine TNF- α und nur geringe IL-6 Spiegel messen. Durch weitere Untersuchungen mit Anti-TNF- α Antikörpern, dem Einbau von ^3H -Thymidin in hepatozelluläre DNA und dem Nachweis von PCNA-Expression (proliferating cell nuclear antigen) in Hepatozyten konnte die Arbeitsgruppe einen entscheidenden positiven Einfluss der Zytokine TNF-

α und IL-6 auf die Leberregeneration trotz niedriger Serumspiegel belegen. Enayati et al. (21) haben in ihrer Arbeit mit PH-Ratten im Serum leicht steigende IL-6 Werte messen können, während TNF- α auch hier nicht nachgewiesen werden konnte. Direkte Messungen der mRNA (messenger RNA) für IL-6 und TNF- α aus in vivo Leberproben zeigten keine Zytokinproduktion. Aus diesen Ergebnissen und der Kenntnis, dass sowohl TNF- α als auch IL-6 eine entscheidende Rolle bei der Regeneration nach PH spielen, schlossen die Kollegen, dass die Zytokine endokrin wirksam sein müssen. Andere Kollegen wie Yamada et al. (124) konnten in ihren Untersuchungen an Mäusen zwei Stunden nach PH einen deutlichen TNF- α Anstieg messen, der nach fünf Stunden bereits wieder signifikant abnahm. Die IL-6 Werte zeigten in dieser Studie ein Maximum nach drei Stunden. In der Hepatektomiestudie unserer Untersuchung lagen zwischen der post OP Blutentnahme und der Abnahme am 1. POP 0:00 zwischen sechs und acht Stunden, weshalb es möglich ist, dass eine systemische TNF- α Ausschüttung direkt nach Hepatektomie nicht erfasst wurde. Als Syntheseort von Zytokinen werden Kupffer-Zellen und Hepatozyten angenommen (13;72). Da diese Zellen in unserem Modell der Hepatektomie fehlen, muss davon ausgegangen werden, dass der postoperative IL-6 Anstieg eine systemische Antwort des Körpers auf die Hepatektomie darstellt und IL-6 zum Beispiel von zirkulierenden Immunzellen (Makrophagen, Leukozyten) ausgeschüttet werden (48).

In der Zusammenschau dieser Studien und der von uns erhobenen Daten kann der postoperative IL-6 Anstieg als Regenerationsreiz gewertet werden. Der gleichzeitige Anstieg der Leukozyten und der Temperatur spricht dagegen für die Entwicklung eines postoperativen SIRS, welches häufig nach großen chirurgischen Eingriffen auftritt (81). Zimmers et al. (129) haben bereits darauf hingewiesen, dass IL-6 für eine normale Regeneration der Leber, neben der Induktion der Hepatozytenproliferation und Apoptosessuppression, auch eine Akute-Phase-Reaktion auslösen muss. Unsere Daten zeigen somit, dass es auch nach totaler Hepatektomie zu einer systemischen Aktivierung des Immunsystems kommt, die sowohl als Trigger für die Leberregeneration als auch als Auslöser eines SIRS gewertet werden kann.

Es gibt bislang nur vereinzelte Publikationen zu Tiermodellen mit Amanitin induziertem ALF (106). Die von uns erreichten Überlebenszeiten der Tiere

übertreffen dabei alle bislang publizierten Daten, welche auch in diesem Modell auf die standardisierte Intensivtherapie der Tiere zurückzuführen ist (113). In unserer Studie regenerierten 50% der Tiere im Sinne einer Wiederaufnahme der Leberfunktion, gemessen am spontanen Anstieg der Thromboplastinzeit. Vergleicht man den Verlauf der IL-6 Konzentrationen der nach Regeneration und Nichtregeneration getrennten Versuchstiere, korreliert das bessere Outcome der REG Gruppe mit einem signifikanten Anstieg des IL-6 zwischen dem 5. und 6. POP und einem parallelen Anstieg der Temperatur im gleichen Zeitraum. Die IL-6 Werte der NOREG Gruppe fallen dagegen schon am 2. POP deutlich ab. Bereits zwischen dem 4. und 5. POP kommt es in der REG Gruppe zu einem Anstieg der TNF- α Werte. Parallel dazu fallen die Werte in der NOREG Gruppe bis an die Nachweisgrenze ab. Die Beurteilung der Ergebnisse wird durch den großen Zeitabstand zwischen den Blutproben erschwert. Dennoch spricht der TNF- α Anstieg der REG Gruppe gefolgt vom Anstieg der IL-6 Werte für die Auslösung eines Regenerationsreizes zwischen dem 4. und 5. POP. Gleichzeitig steigen die Leukozyten ab dem 4. POP über die Normgrenze für Leukozyten beim Schwein und sprechen somit für eine, die Regeneration begleitende, Entwicklung eines SIRS. Im Vergleich zwischen den Gruppen REG und NOREG fällt weiter auf, dass die Tiere der NOREG Gruppe präoperativ und bis zum 3. POP signifikant höhere Leukozytenwerte aufweisen. Die Vermutung liegt nahe, dass die Schweine der NOREG Gruppe bereits mit einem aktivierten Immunsystem in die Versuche gestartet sind. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine vor der Auslösung des ALF bestehende Infektion im Sinne einer Leukozytose die Regeneration der Leber hemmt. Eine denkbare Erklärung wäre, dass die für die Regeneration benötigten Zytokine IL-6 und TNF- α zur Bekämpfung der Infektion an anderer Stelle gebunden beziehungsweise verbraucht werden und somit nicht zur Induktion der Regenerationskaskaden zur Verfügung stehen.

Verglichen mit der Literatur widersprechen unsere Daten und Schlussfolgerungen zum Interleukinverlauf der Regenerationstiere einigen Publikationen zum ALF durch Intoxikation (6;74;100). Diese Studien zum ALF haben zeigen können, dass im Verlauf erhöhte TNF- α und IL-6 Spiegel bei intoxikierten Patienten (Paracetamol, Amanitin, Drogen) mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind. In den Studien wird der Interleukinanstieg und damit das schlechte Outcome mit einem Entzündungsgeschehen in Verbindung gebracht. Unsere Daten sprechen dagegen

für einen positiven Regenerationseffekt, ausgelöst durch die Ausschüttung von Interleukinen. Im Unterschied zu unseren Untersuchungen befassen sich die zitierten Studien mit humanen Patientenpopulationen und hier fast ausschließlich mit Paracetamolvergiftungen. Nur vereinzelt wurden Patienten mit Amanitinvergiftungen und anderen Intoxikationen in die Datenerhebung einbezogen. Neben den Verschiedenheiten der Studienpopulationen können somit auch die Unterschiede des Regenerationsprozesses je nach Ätiologie des Leberversagens eine Rolle beim Zytokinverlauf spielen.

Im Vergleich zwischen Hepatektomie- und Amanitinmodell zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den TNF- α Messungen. Bei den Hepatektomietieren sind trotz Messung der Proben mit einem spezifischeren System nur in drei von 20 Exitusproben TNF- α Werte nachweisbar. Die Bestimmungen im Amanitinmodell zeigen dagegen bei allen Schweinen eine TNF- α Synthese. Da die Synthese von TNF- α im Rahmen der Leberregeneration und Akute-Phase-Reaktion vorwiegend in Kupffer-Zellen stattfindet (1;72), kann dies mit der in situ verbliebenen Restlebermasse nach Amanitinintoxikation erklärt werden. Als zweite denkbare Erklärung muss in Betracht gezogen werden, dass es nach intraportaler Gabe von Amanitin im Vergleich zur Hepatektomie verstärkt zu einer entzündlichen Reaktion der Leber mit entsprechend höherer TNF- α Ausschüttung kommen könnte. Die Vergleichbarkeit der beiden Modelle stellt sich entsprechend eingeschränkt dar. Im Hepatektomiemodell kommt es dagegen trotz fehlender Hepatozyten und Kupffer-Zellen zu vergleichbaren Ausschüttungen von IL-6. Unserer Argumentation eines messbaren Regenerationsreizes trotz totaler Hepatektomie folgend, entsprechen unsere Daten den Publikationen von Enayati et al. (21), die aufgrund der nicht Messbarkeit von TNF- α von einer parakrinen Wirkung des Zytokins ausgehen und von Fujita et al. (29), die die ungestörte IL-6 abhängige Leberregeneration auch bei Fehlen von TNF- α nachweisen konnten.

5. Zusammenfassung

Der Ausfall der Leber ist ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit hoher Mortalität. Bis heute stehen als Therapieoptionen nur supportive Maßnahmen oder die orthotope Lebertransplantation zur Verfügung. Forschungen zu Leberersatzverfahren haben noch nicht zu einem entscheidenden Durchbruch geführt. Mitunter ist dies auf die immer noch nicht vollständig geklärten Pathomechanismen in der Entstehung und im Verlauf eines ALF zurückzuführen.

Untersuchungen an Tiermodellen haben sich in der Forschung zum ALF etabliert. Bis heute konnte noch kein optimales Modell entwickelt werden, wobei das Schwein das vielversprechendste Versuchstier darstellt.

In unserer Studie wurde das ALF beim Schwein zum einen durch eine totale Hepatektomie und in der zweiten Population durch portale Intoxikation mit α -Amanitin induziert.

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine standardisierte und der humanen Intensivtherapie entsprechenden Behandlung der Tiere eine Steigerung der Überlebenszeit über alle bisher publizierten Zeiten - mit und ohne Leberersatztherapie - hinaus erreicht werden konnte.

Nur wenige Studien haben sich bisher auf die Entwicklung der Zytokine und deren Bedeutung im ALF des Tieres fokussiert.

Wir konnten zeigen, dass es auch im Hepatektomiemodell trotz fehlendem Lebergewebe zur Auslösung eines Regenerationsreizes kommt. Im Amanitinmodell spricht die Aktivierung des Immunsystems im Sinne eines IL-6 und TNF- α Anstiegs für eine Regeneration der Leberfunktion und das Überleben der Tiere.

Die zu überprüfenden Fragestellungen können wie folgt beantwortet werden:

- Durch eine der menschlichen Intensivtherapie angepasste postoperative bzw. postintoxikative Therapie kann die Überlebenszeit der Tiere über sämtliche bisher publizierten Zeiten verlängert und so ein breiteres therapeutisches Fenster zur Untersuchung von Therapieverfahren eröffnet werden.
- Die Modelle des ALF zeigen unterschiedliche Zytokinverläufe. So ist im Hepatektomiemodell keine TNF- α Ausschüttung nachweisbar.
- Eine Unterscheidung zwischen SIRS und Regenerationsreiz ist aufgrund der Zytokin-, Leukozyten- und Temperaturverläufe nicht möglich. Im Gegenteil haben unsere Daten gezeigt, dass das SIRS einen essentiellen Bestandteil der Leberregeneration nach ALF darstellt.

- Im Hepatektomiemodell ist trotz vollständiger Resektion des Lebergewebes ein postoperativer Regenerationsreiz bzw. SIRS anhand eines systemischen IL-6 und Leukozytenanstiegs nachweisbar.
- Im Serum der regenerierenden Tiere des Amanitinmodells ist ein Anstieg der TNF- α Werte gefolgt von einem IL-6 Anstieg im Sinne eines SIRS/Regenerationsreizes nachweisbar. Nichtregenerierende Amanitintiere zeigen keinen entsprechenden Zytokinanstieg.

Abkürzungsverzeichnis

ALF	Akutes Leberversagen (engl. Acute Liver Failure)
INR	International Normalized Ratio
HE	Hepatische Enzephalopathie
HELLP-Syndrom	Syndromkomplex aus Hypertonie, erhöhten Transaminasen (Elevated Liver Enzymes) und erniedrigte Thrombozytenzahl (Low Platelets).
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
IL-6	Interleukin 6
IL-1	Interleukin 1
IL-2R	Interleukin 2 Rezeptor
IL-10	Interleukin 10
kDa	Kilodalton
M	Molar
LPS	Lipopolysaccharid
IFN- γ	Interferon γ
OLT	Orthotope Lebertransplantation
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
G	Gauge
Ch	Charrière
pFFP	Porcines Gefrierplasma
pEK	Porcines Erythrozytenkonzentrat
HGF	Hepatic Groth Factor
TGF- α	Tumor Growth Factor α
EGF	Epidermal Groth Factor
HB-EGF	Heparin-binding EGF Like Growth Factor
GH	Growth Hormone
IGFBP1	Insulin Growth Factor Binding Protein 1
EKG	Elektrokardiogramm
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
ZVD	Zentraler Venendruck

ICP	Intrakranieller Druck
prä OP	Präoperativ
post OP	Postoperativ
POP	Postoperativer Tag
PNCA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
PH	Partielle Hepatektomie

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Tab. 1** Unterschiedliche Funktionen von IL-6 modifiziert nach (52;84)
- Tab. 2** Konzentrationsabhängige Wirkungen des TNF- α modifiziert nach (1)
- Abb. 1** PH oder direkte Leberzellschäden triggern die Leberregeneration (aus (110))
- Abb. 2** Portocavocavaler Shunt in situ
- Abb. 3** Gemittelte IL-6-Werte der hepatektomierten Tiere
- Abb. 4** Gemittelte Leukozytenwerte der hepatektomierten Tiere (* / entspricht einer signifikanten Wertänderung zum Vorwert)
- Abb. 5** Gemittelter Verlauf der Körperkerntemperatur der hepatektomierten Schweine (* signifikante Änderung zum präoperativen Wert, * / signifikante Veränderung zum Vorwert)
- Abb. 6** Gemittelte IL-6 Werte der regenerierenden Amanitintiere (REG; * / entspricht einer signifikanten Wertänderung zum Vorwert)
- Abb. 7** Gemittelte IL-6 Werte der nicht regenerierenden Amanitintiere (NOREG)
- Abb. 8** Vergleich der IL-6 Werte der Intoxikationsgruppen Regeneration (REG) und Nichtregeneration (NOREG)
- Abb. 9** Vergleich der TNF- α Werte der Intoxikationsgruppen Regeneration (REG) und Nichtregeneration (NOREG)
- Abb. 10** Vergleich der Leukozytenwerte der Intoxikationsgruppen Regeneration (REG) und Nichtregeneration (NOREG) (* signifikanter Unterschied der beiden Gruppen)

Literaturverzeichnis

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology. Second Edition ed. Philadelphia, USA: W. B. Saunders; 1994. p. 289-316.
2. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ et al. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am.J.Physiol* 1992;263(4 Pt 1):G579-G585.
3. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv.Immunol.* 1993;54:1-78.
4. Aldeguer X, Debonera F, Shaked A, Krasinkas AM, Gelman AE, Que X et al. Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* 2002;35(1):40-8.
5. Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J et al. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett.* 1987;221(1):18-22.
6. Antoniadou CG, Berry PA, Davies ET, Hussain M, Bernal W, Vergani D et al. Reduced monocyte HLA-DR expression: a novel biomarker of disease severity and outcome in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatology* 2006;44(1):34-43.
7. Antoniadou CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J.Hepatol.* 2008;49(5):845-61.
8. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet* 2010;376(9736):190-201.
9. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003;38(3):674-82.
10. Blood D, Hinchcliff K, Radostits O, Gay C. *Veterinary medicine.* 9th edn. ed. London: Saunders WB; 2000. p. 1819-22.
11. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 2009;136(5 Suppl):e28.
12. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S64-S74.

13. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand.J.Immunol.* 2009;69(6):479-91.
14. Chan G, Taqi A, Marotta P, Levstik M, McAlister V, Wall W et al. Long-term outcomes of emergency liver transplantation for acute liver failure. *Liver Transpl.* 2009;15(12):1696-702.
15. Christophi C, Harun N, Fifis T. Liver regeneration and tumor stimulation--a review of cytokine and angiogenic factors. *J.Gastrointest.Surg.* 2008;12(5):966-80.
16. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274(5291):1379-83.
17. Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am.J.Pathol.* 1993;143(6):1606-20.
18. Dahiya P. Burns as a model of SIRS. *Front Biosci.* 2009;14:4962-7.
19. Desille M, Mahler S, Seguin P, Malledant Y, Fremond B, Seville V et al. Reduced encephalopathy in pigs with ischemia-induced acute hepatic failure treated with a bioartificial liver containing alginate-entrapped hepatocytes. *Crit Care Med.* 2002;30(3):658-63.
20. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007;35(5):1244-50.
21. Enayati P, Brennan MF, Fong Y. Systemic and liver cytokine activation. Implications for liver regeneration and posthepatectomy endotoxemia and sepsis. *Arch.Surg.* 1994;129(11):1159-64.
22. Enjalbert F, Rapior S, Nouguiet-Soule J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* 2002;40(6):715-57.
23. Fabrikant JI. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J.Cell Biol.* 1968;36(3):551-65.
24. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1):S45-S53.
25. Fondevila C, Hessheimer AJ, Taura P, Sanchez O, Calatayud D, de Riva N et al. Portal hyperperfusion: mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transpl.* 2010;16(3):364-74.
26. Fraunberger, P., Muehlbayer, D., Engelschalk, C., Lohse, P., Reiter, W., Oberneder, R., and Liedl, P. Aktuelle Mitteilungen aus dem Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München. *Vogeser, M.* 30-1-2000.

27. Fraunberger, P., Muehlbayer, D., Engelschalk, C., Lohse, P., Reiter, W., Oberneder, R., and Liedl, P. Aktuelle Mitteilungen aus dem Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München. Vogeser, M. 30-1-2000.
28. Fruhauf NR, Radunz S, Grabellus F, Laube T, Uerschels AK, Kaiser GM. Neuromonitoring in a porcine model of acute hepatic failure. *Lab Anim* 2011;45(3):174-8.
29. Fujita J, Marino MW, Wada H, Jungbluth AA, Mackrell PJ, Rivadeneira DE et al. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 2001;129(1):48-54.
30. Gaglio PJ, Baskin G, Bohm R, Jr., Blanchard J, Cheng S, Dunne B et al. Partial hepatectomy and laparoscopic-guided liver biopsy in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): novel approach for study of liver regeneration. *Comp Med.* 2000;50(4):363-8.
31. Galun E, Zeira E, Pappo O, Peters M, Rose-John S. Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J.* 2000;14(13):1979-87.
32. Gao Y, Mu N, Xu XP, Wang Y. Porcine acute liver failure model established by two-phase surgery and treated with hollow fiber bioartificial liver support system. *World J.Gastroenterol.* 2005;11(35):5468-74.
33. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84(20):7251-5.
34. Gerlach JC, Botsch M, Kardassis D, Lemmens P, Schon M, Janke J et al. Experimental evaluation of a cell module for hybrid liver support. *Int.J.Artif.Organs* 2001;24(11):793-8.
35. Guder WG, Nolte J. Laborparameter von A-Z. In: Guder WG, Nolte J, editors. *Das Laborbuch für Klinik und Praxis.* 1 ed. 2005. p. 956-7.
36. Harrison DA, Welch CA, Eddleston JM. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. *Crit Care* 2006;10(2):R42.
37. Heper Y, Akalin EH, Mistik R, Akgoz S, Tore O, Goral G et al. Evaluation of serum C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 levels as diagnostic and prognostic parameters in patients with community-acquired sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 2006;25(8):481-91.
38. Herold G. Leber. In: Herold G, editor. *Innere Medizin.* 2010 ed. 2010. p. 498-543.

39. Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985;82(16):5490-4.
40. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324(6092):73-6.
41. Ho CK, Lee CW, Lu J, Wu J, Koh WP, Chan CY et al. New hope for an old cure: a pilot animal study on selective venesection in attenuating the systemic effects of ischaemic-reperfusion injury. *Ann.Acad.Med.Singapore* 2009;38(7):569-7.
42. Hochleitner B, Hengster P, Bucher H, Ladurner R, Schneeberger S, Krismer A et al. Significant survival prolongation in pigs with fulminant hepatic failure treated with a novel microgravity-based bioartificial liver. *Artif.Organs* 2006;30(12):906-14.
43. Hong F, Kim WH, Tian Z, Jaruga B, Ishac E, Shen X et al. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. *Oncogene* 2002;21(1):32-43.
44. James LP, Lamps LW, McCullough S, Hinson JA. Interleukin 6 and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity in the mouse. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003;309(4):857-63.
45. Janeway CA, Travers P, Walport M, Sholmchik M. *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease.* 5ed. 2001.
46. Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi--an overview. *Toxicon* 2003;42(4):339-49.
47. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988;332(6159):83-5.
48. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2001;280(5):E745-E751.
49. Khalili TM, Navarro A, Ting P, Kamohara Y, Arkadopoulos N, Solomon BA et al. Bioartificial liver treatment prolongs survival and lowers intracranial pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Artif.Organs* 2001;25(7):566-70.
50. Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Petersen BE, Michalopoulos GK. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 1997;26(4):896-904.
51. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989;74(1):1-10.

52. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86(4):1243-54.
53. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 1992;258(5082):593-7.
54. Knubben K, Thiel C, Schenk M, Etspuler A, Schenk T, Morgalla MH et al. A new surgical model for hepatectomy in pigs. *Eur.Surg.Res.* 2008;40(1):41-6.
55. Knubben K, Thiel C, Schenk M, Etspuler A, Schenk T, Morgalla MH et al. A new surgical model for hepatectomy in pigs. *Eur.Surg.Res.* 2008;40(1):41-6.
56. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J.Am.Coll.Surg.* 2003;197(4):634-59.
57. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368(6469):339-42.
58. Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* 2000;31(1):149-59.
59. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J.Biol.Chem.* 2001;276(28):26605-13.
60. Kramer L. Acute liver failure. *Wien.Klin.Wochenschr.* 2004;116(3):67-81.
61. Kristiansen RG, Lindal S, Myreng K, Revhaug A, Ytrebo LM, Rose CF. Neuropathological changes in the brain of pigs with acute liver failure. *Scand.J.Gastroenterol.* 2010;45(7-8):935-43.
62. LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am.J.Gastroenterol.* 1994;89(8 Suppl):S86-S96.
63. Ladurner R, Hochleitner B, Schneeberger S, Barnas U, Krismer A, Kleinsasser A et al. Extended liver resection and hepatic ischemia in pigs: a new, potentially reversible model to induce acute liver failure and study artificial liver support systems. *Eur.Surg.Res.* 2005;37(6):365-9.
64. Larson AM. Diagnosis and management of acute liver failure. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2010;26(3):214-21.
65. Lee KU, Zheng LX, Cho YB, Kim KH, Ha J, Suh KS et al. An experimental animal model of fulminant hepatic failure in pigs. *J.Korean Med.Sci.* 2005;20(3):427-32.
66. Lee WM. Acetaminophen-related acute liver failure in the United States. *Hepatology* 2008;38(s1The 6 Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Liver Failure: Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September 2007, Iwate, Japan):S3-S8.

67. Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008;47(4):1401-15.
68. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury* 2007;38(12):1336-45.
69. Li W, Liang X, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001;33(6):1377-86.
70. Maione D, Di Carlo E, Li W, Musiani P, Modesti A, Peters M et al. Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *EMBO J.* 1998;17(19):5588-97.
71. Masubuchi Y, Bourdi M, Reilly TP, Graf ML, George JW, Pohl LR. Role of interleukin-6 in hepatic heat shock protein expression and protection against acetaminophen-induced liver disease. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003;304(1):207-12.
72. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J.Cell Physiol* 2007;213(2):286-300.
73. Muehling BM, Ortlieb L, Oberhuber A, Orend KH. Fast track management reduces the systemic inflammatory response and organ failure following elective infrarenal aortic aneurysm repair. *Interact.Cardiovasc.Thorac.Surg.* 2011;12(5):784-8.
74. Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J.Infect.Dis.* 2000;182(4):1103-8.
75. Nakazawa K, Ijima H, Fukuda J, Sakiyama R, Yamashita Y, Shimada M et al. Development of a hybrid artificial liver using polyurethane foam/hepatocyte spheroid culture in a preclinical pig experiment. *Int.J.Artif.Organs* 2002;25(1):51-60.
76. Newsome PN, Henderson NC, Nelson LJ, Dabos C, Filippi C, Bellamy C et al. Development of an invasively monitored porcine model of acetaminophen-induced acute liver failure. *BMC.Gastroenterol.* 2010;10:34.
77. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl.* 2000;6(1):21-31.
78. Nguyen NT, Vierling JM. Acute liver failure. *Curr.Opin.Organ Transplant.* 2011;16(3):289-96.
79. Nieuwoudt M, Kunnike R, Smuts M, Becker J, Stegmann GF, Van der WC et al. Standardization criteria for an ischemic surgical model of acute hepatic failure in pigs. *Biomaterials* 2006;27(20):3836-45.
80. Northemann W, Hattori M, Baffet G, Braciak TA, Fletcher RG, Abraham LJ et al. Production of interleukin 6 by hepatoma cells. *Mol.Biol.Med.* 1990;7(3):273-85.

81. Nystrom PO. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J.Antimicrob.Chemother.* 1998;41 Suppl A:1-7.
82. Olsson I. The cytokine network. *J.Intern.Med.* 1993;233(2):103-5.
83. Peters M, Blinn G, Jostock T, Schirmacher P, Meyer zum Buschenfelde KH, Galle PR et al. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* 2000;119(6):1663-71.
84. Possamai LA, Antoniadou CG, Anstee QM, Quaglia A, Vergani D, Thursz M et al. Role of monocytes and macrophages in experimental and human acute liver failure. *World J.Gastroenterol.* 2010;16(15):1811-9.
85. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA* 1997;277(13):1058-63.
86. Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int.J.Exp.Pathol.* 2000;81(2):145-57.
87. Rahman TM, Selden AC, Hodgson HJ. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J.Surg.Res.* 2002;106(2):264-72.
88. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995;273(2):117-23.
89. Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A, Gonzalez-Reimers E, Milena A, de la Vega MJ et al. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine* 2001;15(4):232-6.
90. Rolando N, Harvey F, Brahm J, Philpott-Howard J, Alexander G, Gimson A et al. Prospective study of bacterial infection in acute liver failure: an analysis of fifty patients. *Hepatology* 1990;11(1):49-53.
91. Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000;32(4 Pt 1):734-9.
92. Ronco C, Tetta C, Mariano F, Wratten ML, Bonello M, Bordoni V et al. Interpreting the mechanisms of continuous renal replacement therapy in sepsis: the peak concentration hypothesis. *Artif.Organs* 2003;27(9):792-801.
93. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29(2):403-11.
94. Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* 2000;28(8):2793-8.

95. Sheil AG, Sun J, Wang L, Rao N, Mears DC, Wang C et al. A biodialysis system for liver support tested in a porcine hepatic failure model. *Aust.N.Z.J.Surg.* 2000;70(2):127-31.
96. Shen HN, Lu CL, Yang HH. Epidemiologic trend of severe sepsis in Taiwan from 1997 through 2006. *Chest* 2010;138(2):298-304.
97. Sosef MN, Abrahamse LS, van de Kerkhove MP, Hartman R, Chamuleau RA, van Gulik TM. Assessment of the AMC-bioartificial liver in the anhepatic pig. *Transplantation* 2002;73(2):204-9.
98. Sosef MN, van Gulik TM. Total hepatectomy model in pigs: revised method for vascular reconstruction using a rigid vascular prosthesis. *Eur.Surg.Res.* 2004;36(1):8-12.
99. Spittler A, Razenberger M, Kupper H, Kaul M, Hackl W, Boltz-Nitulescu G et al. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin.Infect.Dis.* 2000;31(6):1338-42.
100. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U et al. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 2000;119(2):446-60.
101. Stutchfield BM, Simpson KJ, Wigmore SJ. Is there a role for extracorporeal liver support as a bridge to liver transplantation in acute liver failure? *Transplantation* 2011;92(8):e44-e45.
102. Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99(17):11181-6.
103. Suarez-Santamaria M, Santolaria F, Perez-Ramirez A, Aleman-Valls MR, Martinez-Riera A, Gonzalez-Reimers E et al. Prognostic value of inflammatory markers (notably cytokines and procalcitonin), nutritional assessment, and organ function in patients with sepsis. *Eur.Cytokine Netw.* 2010;21(1):19-26.
104. Sun R, Tian Z, Kulkarni S, Gao B. IL-6 prevents T cell-mediated hepatitis via inhibition of NKT cells in CD4+ T cell- and STAT3-dependent manners. *J.Immunol.* 2004;172(9):5648-55.
105. Takada Y, Ishiguro S, Fukunaga K. Large-animal models of fulminant hepatic failure. *J.Artif.Organs* 2003;6(1):9-13.
106. Takada Y, Ishiguro S, Fukunaga K, Gu M, Taniguchi H, Seino KI et al. Increased intracranial pressure in a porcine model of fulminant hepatic failure using amatoxin and endotoxin. *J.Hepatol.* 2001;34(6):825-31.
107. Takahashi K, Umehara Y, Umehara M, Nishimura A, Narumi S, Toyoki Y et al. Plasma exchange-based plasma recycling dialysis system as an artificial liver support. *Ther.Apher.Dial.* 2008;12(4):264-70.

108. Takala A, Nupponen I, Kylanpaa-Back ML, Repo H. Markers of inflammation in sepsis. *Ann.Med.* 2002;34(7-8):614-23.
109. Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J.Clin.Invest* 2003;112(7):978-80.
110. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2004;5(10):836-47.
111. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig.Dis.Sci.* 1991;36(6):770-4.
112. Thiel C, Thiel K, Etspueler A, Morgalla MH, Rubitschek S, Schmid S et al. A Reproducible Porcine Model of Acute Liver Failure Induced by Intrahepatic Acetaminophen Administration. *Eur.Surg.Res.* 2011;46(3):118-26.
113. Thiel C, Thiel K, Etspueler A, Schenk T, Morgalla MH, Koenigsrainer A et al. Standardized intensive care unit management in an anhepatic pig model: new standards for analyzing liver support systems. *Crit Care* 2010;14(4):R138.
114. Thiel C, Thiel K, Klingert W, Diewold A, Scheuermann K, Hawerkamp E et al. The enterohepatic circulation of amanitin: kinetics and therapeutic implications. *Toxicol.Lett.* 2011;203(2):142-6.
115. Thiel K, Schenk M, Etspuler A, Schenk T, Morgalla MH, Konigsrainer A et al. A simple dummy liver assist device prolongs anhepatic survival in a porcine model of total hepatectomy by slight hypothermia. *BMC.Gastroenterol.* 2011;11:79.
116. Tunon MJ, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J.Gastroenterol.* 2009;15(25):3086-98.
117. Van Damme J, Opdenakker G, Simpson RJ, Rubira MR, Cayphas S, Vink A et al. Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 1987;165(3):914-9.
118. van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik TM, Chamuleau RA. Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials* 2004;25(9):1613-25.
119. Vaquero J, Polson J, Chung C, Helenowski I, Schiodt FV, Reisch J et al. Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Gastroenterology* 2003;125(3):755-64.
120. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 1998;36(1):13-24.
121. White P, Brestelli JE, Kaestner KH, Greenbaum LE. Identification of transcriptional networks during liver regeneration. *J.Biol.Chem.* 2005;280(5):3715-22.

122. Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J et al. Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J.Biol.Chem.* 2003;278(13):11281-8.
123. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94(4):1441-6.
124. Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology* 1998;28(4):959-70.
125. Yasuda H, Mine T, Shibata H, Eto Y, Hasegawa Y, Takeuchi T et al. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. *J.Clin.Invest* 1993;92(3):1491-6.
126. Yoshioka M, Mori Y, Miyazaki S, Miyamoto T, Yokomizo Y, Nakajima Y. Biological functions of recombinant bovine interleukin 6 expressed in a baculovirus system. *Cytokine* 1999;11(11):863-8.
127. Ytrebo LM, Nedredal GI, Langbakk B, Revhaug A. An experimental large animal model for the assessment of bioartificial liver support systems in fulminant hepatic failure. *Scand.J.Gastroenterol.* 2002;37(9):1077-88.
128. Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* 2003;38(2):326-34.
129. Zimmers TA, Pierce RH, McKillop IH, Koniaris LG. Resolving the role of IL-6 in liver regeneration. *Hepatology* 2003;38(6):1590-1.

Danke.

An meinen Doktorvater Prof. Dr. Alfred Königsrainer für die freundliche Überlassung meines Dissertationsthemas.

Dr. Martin Schenk für seine langjährige Betreuung und Unterstützung.

An Dr. Karolin Thiel und Dr. Christian Thiel für die immer offenen Ohren und unzähligen konstruktiven Abendessen.

Meiner Familie, die mich immer und in allen Formen unterstützt hat.

Michael Moore for his short but intense support.

Lebenslauf

Alexander Mathias Philipp Etspüler

Persönliche Angaben:

Geburtstag: 05.02.1979
Geburtsort: Mühlacker
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang:

1985–1989 Schiller-Grundschule in Bretten
1989–1998 Melanchthon Gymnasium in Bretten
17.06.98 Abitur

Universitäre Ausbildung:

ab SS 2000 Humanmedizin in Tübingen
24.11.2006 Staatsexamen und Approbation

Klinische Ausbildung:

10/2005-09/2006 Praktisches Jahr am Marienhospital Stuttgart Prof. Bittner, Prof. Dittel und Dr. Junginger und am Kantonsspital St. Gallen (Schweiz) Prof. Dr. Rickli und Pneumologie Dr. Dr. h.c. Knoblauch

02/2007-01/2009 Assistenzarzt an der Universitätsklinik der Anaesthesiologie und Intensivmedizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Prof. Unertl)

Seit 04/2009 Assistenzarzt an der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Zwissler)