

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. Königsrainer**

**Entwicklung eines Modells des
Paracetamol-induzierten akuten
Leberversagens
und Vergleich von Leberersatzverfahren
am Schwein**

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

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

**vorgelegt von
Sofia Magdalena Rubitschek
aus
Northeim**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Königsrainer

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Akutes Leberversagen	1
1.2 Paracetamolinduzierte Leberschädigungen	4
1.3 Ursachen der Paracetamoltoxizität	5
1.4 Therapeutische Ansätze.....	8
1.4.1 Behandlung mit Antidoten.....	8
1.4.2 Eliminierung toxischer Substanzen.....	10
1.5 Tiermodell.....	13
1.6 Fragestellung.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Tiere.....	17
2.1.2 Überwachung.....	17
2.1.3 Einleitung und operative Eingriffe	17
2.1.4 Medikamente und Infusionen.....	18
2.1.5 MARS-Therapie	18
2.1.6 Glutathionbestimmung.....	19
2.1.7 Proteinbestimmung	20
2.1.8 NAD/NADH-Bestimmung	20
2.1.9 Geräte	21
2.1.10 Programme	21
2.1.11 Messwerte und Darstellung	21
2.2 Methode	22
2.2.1 Tiermodell	22
2.2.1.1 Tiere, Versuchsvorbereitung und Induktion des Leberversagens	
22	
2.2.1.2 Intensivmedizinische Überwachung.....	24

2.2.1.3	Gewinnung der Schweineblutkonserven.....	25
2.2.1.4	Entnahme von Lebergewebe	25
2.2.1.5	Studiengruppierung und Therapie.....	25
2.2.1.6	Aufbereitung der Stickstoffproben.....	27
2.2.1.6.1	Glutathion- und Proteinbestimmung	27
2.2.1.6.2	NAD/NADH-Bestimmung.....	27
2.2.2	Messmethoden und Bestimmung	28
2.2.2.1	Methode zur Glutathionbestimmung	28
2.2.2.2	Messung der Glutathionkonzentration	29
2.2.2.2.1	Totales Glutathion	29
2.2.2.2.2	Oxidiertes Glutathion	29
2.2.2.3	Proteinbestimmung	29
2.2.2.4	Messung der NAD/NADH-Konzentration	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Tiermodell.....	30
3.1.1	Etablierung des Modells, Dosisfindung.....	30
3.1.2	Entwicklung der Parameter.....	31
3.1.2.1	Intensivmedizinische Parameter	31
3.1.2.2	Laborparameter im Blut.....	33
3.1.3	Darstellung der Therapiegruppen	36
3.2	GSH/GSSG-Konzentration im Lebergewebe	54
3.3	NAD/NADH-Gehalt im Lebergewebe	56
4	Diskussion	58
5	Zusammenfassung	68
6	Literatur.....	70

Abkürzungsverzeichnis

ALV	Akutes Leberversagen
ATP	Adenosin-Triphosphat
AZ	Allgemeinzustand
BGA	Blutgasanalyse
DILI	Drogeninduzierte Leberschädigung (Drug-induced liver injury)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
FFP	Fresh frozen plasma
FiO ₂	Sauerstoffkonzentration im Beatmungsgemisch
G	Gravitationskonstante
GGT	Glutaryl-Cystein-Synthetase, Gamma-Glutamyl-Transferase
GLU	Glutathion
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert, Glutathiondisulfid
HAES	Hydroxyethylstärke
Hb	Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HF	Herzfrequenz
HRS	Hepatorenales Syndrom

i. m.	intramuskulär
INR	International normalized ratio
i. v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LEV	Leberersatzverfahren
LV	Leberversagen
MAP	arterieller Mitteldruck
MARS	Molecular adsorbent recirculation system
MetHb	Methämoglobin- Konzentration
MW	Mittelwert
NAC	N-Acetylcystein
NAD/NADH	Nikotinsäureamid-Adenindinukleotid oxidiert / reduziert
NADP	Nicotinsäureamid-Adenindinukleotid-Phosphat oxidiert
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenindinukleotid-Phosphat reduziert
NAPQI	N-Acetyl-p-Benzoquinonimin
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
OP	Operation
PCM	Paracetamol
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PIP	inspiratorischer Spitzendruck
POP	postoperativer Tag
PPK	Plasma-Paracetamolkonzentration
PTT	partielle Thromboplastinzeit

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reaktive oxygen species)
S	Standardabweichung
SF	Standardfehler
SpO ₂	periphere Sauerstoffsättigung
SSA	Sulfosalicylsäure
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
ZVD	zentralvenöser Druck

1 **Einleitung**

1.1 **Akutes Leberversagen**

Das akute Leberversagen (ALV) ist ein relativ seltenes, dafür umso komplizierteres Krankheitsbild, welches die moderne Medizin immer wieder vor eine Herausforderung stellt. Seit Langem wird das ALV als akuter Funktionsverlust der Leber ohne zuvor bekannte Lebererkrankung mit Entwicklung einer Enzephalopathie $> I^{\circ}$ innerhalb von 8 Wochen definiert (72;87). Mittlerweile werden jedoch verschiedene Stadien unterschieden. Entwickelt sich eine Enzephalopathie innerhalb von 7 Tagen nach Auftreten eines Ikterus, spricht man von einer hyperakuten Form. Handelt es sich um einen Zeitraum von 7 bis 28 Tagen, entspricht es einer akuten, bei mehr als 28 Tagen einer subakuten Verlaufsform (71;73). Die Schwierigkeit einer genaueren Definitionsfindung dieses Krankheitsbildes liegt in seiner sehr heterogenen klinischen Erscheinung begründet. Der „Acute Liver Failure Study Group“ zufolge wird aktuell eine INR (international normalized ratio) $> 1,5$ und die Entwicklung einer Enzephalopathie, sowie eine Krankheitsdauer < 24 Wochen als am ehesten definierend für ein ALV angesehen (54). Durch verschiedene Klassifikationen (King's College Criteria, APACHE, Clichy's criteria, MELD) wurde der Versuch unternommen, die schwere des LV und seine Prognose genauer zu bestimmen (41;42;45;91). Die Vielzahl dieser Klassifikationen zeigt jedoch, wie schwierig es ist, definierende Faktoren und verlässliche Prognose-Parameter zu finden.

Als Auslöser für ein ALV kommen eine virale Hepatitis, eine Medikamenten- und/oder Toxin-induzierte Leberschädigung, metabolische Störungen, Ischämie und diverse seltenere Ursachen (Morbus Wilson, Budd-Chiari Syndrom etc.) in Betracht. In jeder Form muss das ALV als Syndrom betrachtet werden, da es multiple bzw. multifaktorielle Ursachen hat und unterschiedliche Symptome zeigt, die den Grad der Erkrankung individuell stark variieren lässt (54). Diese starke Varianz des Erkrankungsgrades und des Krankheitsbildes erschweren die frühzeitige Diagnose und den rechtzeitigen Therapiebeginn. Mit 46% bei Erwachsenen und 12% bei Kindern gilt Paracetamol (PCM, Acetaminophen) als

häufigste bekannte Ursache eines ALV in den USA, wohingegen bei 15% der Erwachsenen und über 50% der pädiatrischen Patienten keine Ursache diagnostizierbar ist. Diese Zahlen können jedoch je nach Land stark variieren (siehe Abb.1.1), wobei auffällt, dass besonders in asiatischen Ländern eine virale Genese der weitaus häufigste Grund für die Entwicklung eines ALV darstellt und medikamentöse Intoxikationen eher von nachrangigem Stellenwert sind.

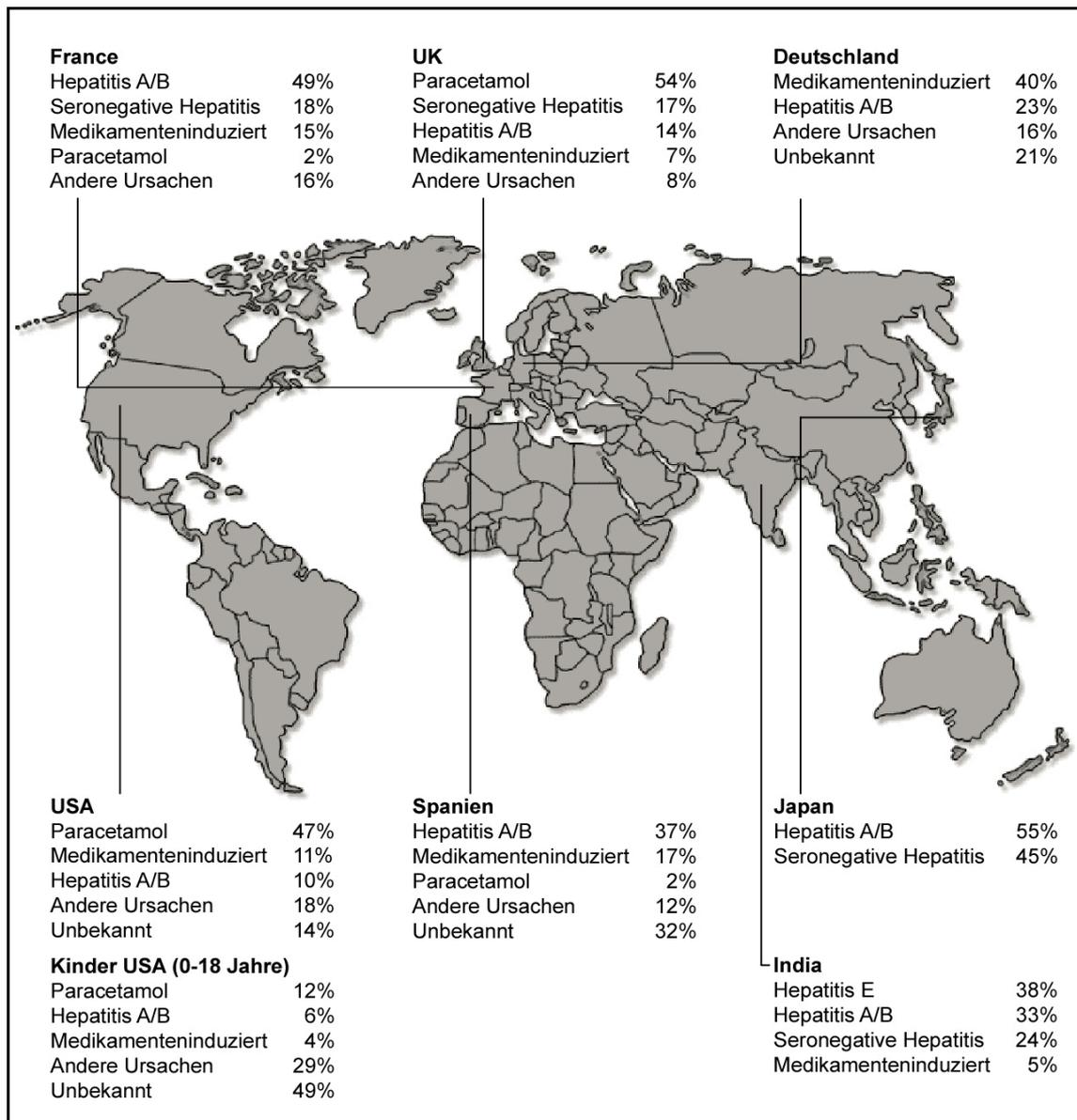


Abb.1.1: Ursachen des akuten Leberversagens verschiedener Länder. Zusammengestellt aus (11;22;54;71).

Die Diagnosesicherung eines ALV erfolgt in erster Linie über die Feststellung einer ausgeprägten Koagulopathie (INR ↑, PTT ↑) und dem Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie (54;74). Außerdem werden Veränderungen diverser Serumparameter (GOT ↑, Bilirubin ↑, Kreatinin ↑, arterieller pH ↓) zur Sicherung der Diagnose herangezogen, die jedoch aufgrund der hohen Varianz der Veränderungen keinesfalls als definierend angesehen werden können. Weitere Symptome sind hämodynamische Störungen, Vasodilatation, renale Insuffizienz und Leberzellnekrose mit daraus resultierender Inflammation. Im weiteren Krankheitsverlauf können sich Sepsis, Koma und Tod durch zerebrales Ödem und/oder Multiorganversagen entwickeln, was auf eine Veränderung von Durchblutung und Sauerstoffsättigung der Organe zurückzuführen ist (54;74).

Als einzige wirksame kurative Therapie gilt heutzutage die orthotope Lebertransplantation, welche aber aufgrund mangelnder Spenderorgane und eines schnell fortschreitenden Krankheitsverlaufs nur begrenzt durchführbar ist (12). Bevor die Möglichkeit einer Organtransplantation bestand, betrug die Mortalität des ALV 80% (54). Diese Prognose hat sich zwar verbessert, ist aber noch immer sehr ungünstig. Laut einer prospektiven Studie der U.S. „Acute Liver Failure Study Group“ im Zeitraum von 1998 bis 2007 war bei 45% aller ALV-Patienten eine Spontanheilung zu beobachten. Weitere 44% wurden für eine Transplantation gelistet, wobei 25% ein Spenderorgan bekamen, 10% starben ohne ein Organ zu bekommen und 9% sich ohne Transplantation wieder erholten (siehe Abb.1.2) (54).

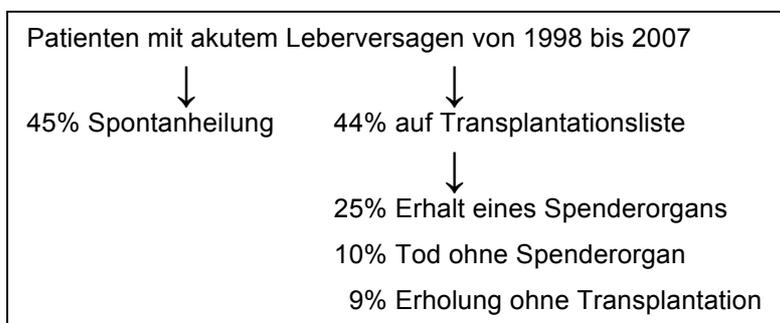


Abb.1.2: Studie der U.S. „Acute Liver Failure Group“ im Zeitraum von 1998 bis 2007.
Entnommen aus (54).

Bei einer Gesamt-Mortalität von 30% (54) ist in neuester Zeit festzustellen, dass der Anteil der Patienten, die ein letales zerebrales Ödem entwickeln, gegenüber denen, die den Folgen eines Multiorganversagens erliegen, geringer wird. Diese Entwicklung begründet sich in einer starken Verbesserung der Therapie- und Behandlungsmöglichkeiten des zerebralen Ödems (9).

1.2 Paracetamolinduzierte Leberschädigungen

Als weit verbreitetes Antipyretikum und Analgetikum ist PCM schon seit Langem als hepatotoxische Substanz bekannt, welche bei Überschreitung der als ungefährlich geltenden Tageshöchst-dosis von 4g zu einer toxininduzierten Leberschädigung (engl. Drug-induced liver injury; DILI) und einem ALV führen kann (54;69). Diese Höchstdosis kann jedoch nur eingeschränkt gelten, da die Dosisverträglichkeit mit zunehmender vorbestehender Leberschädigung und in Abhängigkeit verschiedener Parameter wie z.B. Adipositas abnimmt (10;51;80). In den Vereinigten Staaten und Großbritannien gilt PCM als Hauptursache für eine DILI (50;69;71). Jährlich sterben rund 400 Menschen in den Vereinigten Staaten (52;54) und 200-500 Menschen in Großbritannien an den Folgen eines durch PCM induzierten ALV (54;71), wobei über die Jahre gesehen ein prozentualer Anstieg zu verzeichnen ist. In den Jahren 1998 bis 2007 waren von 1147 ALV-Fällen in den USA 46% auf eine PCM-Überdosis zurückzuführen (54), wobei es 1998 noch 28%, im Jahre 2003 jedoch bereits 51% waren (50).

Die Überdosierung kann entweder in suicidalen Absicht erfolgen, wobei Einnahmemengen von bis zu 90 g beobachtet werden (54), oder unbeabsichtigt sein. Letzteres kann entweder durch Langzeitmedikation und/oder durch die kombinierte Einnahme mehrerer paracetamolhaltiger Medikamente verursacht sein (50;54), was bei 50% der Patienten der Fall ist (53).

Um eine Aussage über die Prognose nach Intoxikation machen zu können, ist die Kenntnis der Dosis und das Intervall zwischen Einnahme und Behandlungsbeginn entscheidend. Bei ungewollten Überdosierungen sind die genaue Dosis und der Einnahmezeitpunkt häufig unbekannt und die Vorstellung in der Ambulanz erfolgt aufgrund der milden und unspezifischen Symptomatik wie leichter

Übelkeit, Erbrechen und Magenbeschwerden (81) meist spät, was des Öfteren in schweren Leberschädigungen resultiert. Bei einer Einnahme in suicidalen Absicht ist der Verlauf einfacher abzuschätzen, da in diesen Fällen die Dosis und der Einnahmezeitpunkt meist bekannt sind. Nach Eintritt eines ALV ist die Prognose jedoch für all diese Patienten gleich (50;52).

1.3 Ursachen der Paracetamoltoxizität

Das Tripeptid Glutathion (GLU) setzt sich aus den Aminosäuren Glycin, Glutamat und Cystein zusammen. Die zur GLU *de novo* Synthese notwendige Enzymausstattung ist zwar in vielen Zellarten zu finden, der überwiegende Anteil dieser Synthese findet jedoch in der Leber statt. Die Synthese beginnt mit der durch die Glutamylcystein-Synthetase (GGT) katalysierten ATP-abhängigen Konjugation von Cystein und Glutamat und wird durch die Addition von Glycin mittels der Glutathionsynthetase vollendet. Limitiert wird diese Reaktion durch die relativ geringe intrazelluläre Cysteinkonzentration (18;43;78;86).

Der GLU-Gehalt in der Zelle setzt sich aus 85-90% reduziertem Glutathion (GSH) und 10-15% der oxidierten Form (GSSG) zusammen. Dieses RedOx-System stellt ein fein reguliertes Fließgleichgewicht dar, dessen Aufrechterhaltung für die Zelle essentiell ist. Das Enzym Glutathionreduktase, welches die Reduktion von GSSG zu GSH katalysiert, ist maßgeblich an der ständigen Regeneration von GSH und somit dem Beibehalten des RedOx-Status beteiligt. GSH ist, neben der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die fortlaufend während der Zellatmung anfallen, unter anderem auch an der Entgiftung von Schwermetallen und anderen Xenobiotika beteiligt. Die Entgiftung erfolgt, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase, durch die Kopplung an die Cysteinsulfhydrylgruppe von GSH, was eine Eliminierung ermöglicht (18;43;78). Ein weiterer Entgiftungsprozess verläuft über das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Cytochrom P450-System (75). Dieses Oxigenase-System ist für die Umwandlung lipophiler in hydrophile Substanzen verantwortlich und ermöglicht so die Ausscheidung in Urin und Galle (14;92).

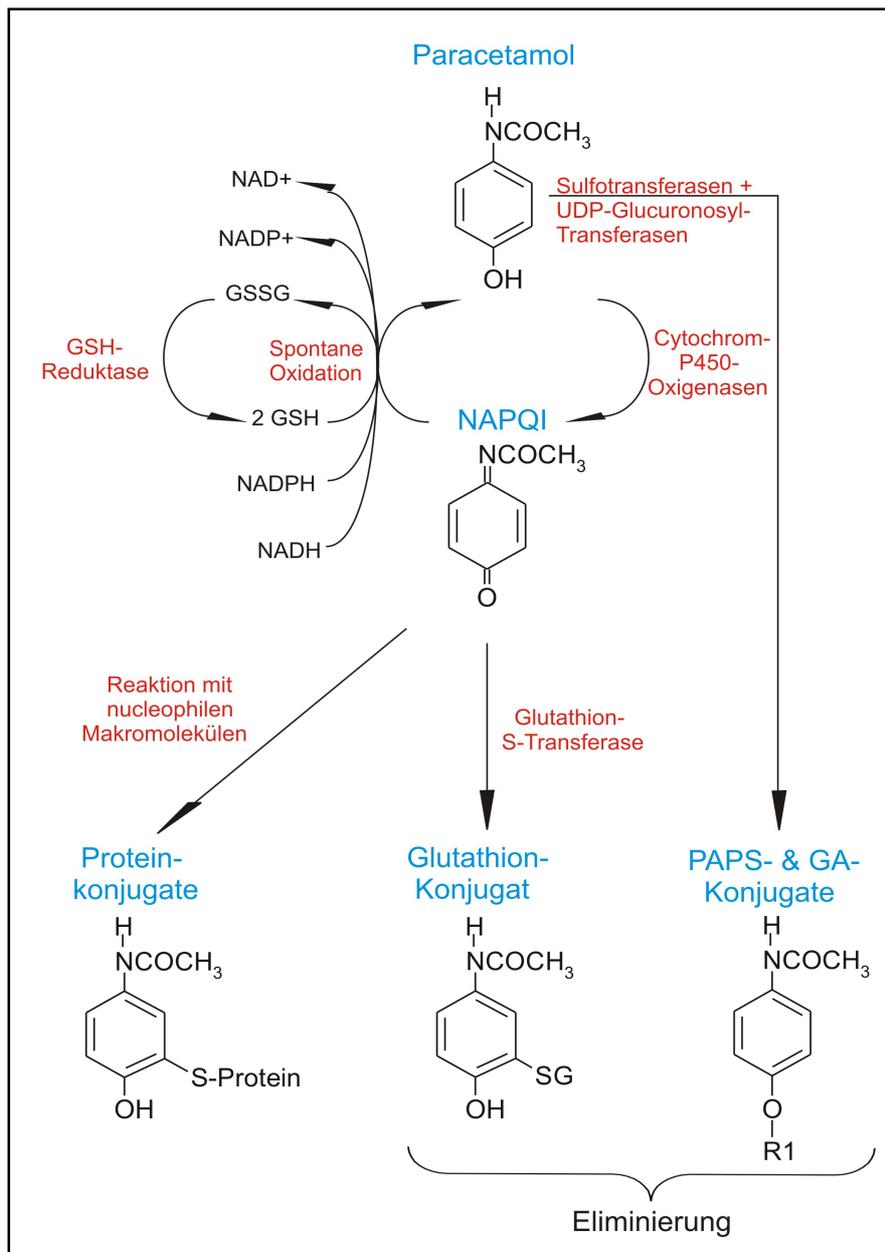


Abb.1.3: Übersicht Paracetamolmetabolismus. Zusammengestellt aus (3;13;16;39).

Die Metabolisierung von PCM zu nicht toxischen Produkten wird in erster Linie durch eine katalytisch vermittelte Glucuronisation und Sulfatisierung erreicht, was eine Eliminierung über Galle und Harn erlaubt (siehe Abb.1.3) (30;67). Über das Cytochrom P450-System wird jedoch immer ein signifikanter Teil des PCM zum reaktiven Metabolit N-Acetyl-p-Benzoquinonimin (NAPQI) verstoffwechselt, der in der Zelle schnell an GLU gekoppelt und dadurch eliminiert werden kann.

Bei einer PCM-Überdosierung kommt es durch die Entgiftung von NAPQI zum vollständigen Verbrauch des zellulären GSH-Kontingents. Dies führt schließlich dazu, dass NAPQI in der Zelle akkumuliert (30;40;60;61;67) und nun sowohl als Elektrophil als auch als Oxidationsmittel wirken kann (29).

Als Elektrophil konjugiert es an Sulfhydrylgruppen von Proteinen (siehe Abb.1.1.) (4;49), was wiederum zur Funktionsbeeinträchtigung oder zum Funktionsverlust dieser Proteine führt. Viele Zielproteine von NAPQI sind bereits identifiziert, der massive Zelluntergang nach einer PCM-Intoxikation kann jedoch nicht auf ein Einzelnes zurückgeführt werden (46).

Als Oxidationsmittel reagiert NAPQI sowohl mit den Reduktionsäquivalenten NADPH und NADH als auch mit GSH. Dies führt in erster Linie zur Regeneration von PCM und zu einer erhöhten GSSG-Konzentration. Es ist aber auch eine Depletion von NADPH und NADH zu beobachten (siehe Abb.1.3) (16). Da NADPH auch als Coenzym der Glutathionreduktase benötigt wird, ist die Regeneration von GSH beeinträchtigt, was den GSSG-Gehalt noch zusätzlich steigert (4;49).

Diese Akkumulation von GSSG verursacht die Inaktivierung mehrerer essentieller Enzyme, was starke Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion, des metabolischen und energetischen Gleichgewichts und eine Erniedrigung der NADH- und ATP-Konzentration zur Folge hat (4;47). Vor allem die Gluconeogenese, die β -Oxidation und die Ureagenese, aber auch viele andere Stoffwechselwege sind auf ausreichend ATP angewiesen und können durch den nunmehr erniedrigten Gehalt nicht in ausreichendem Umfang stattfinden (37).

Als Voraussetzung für die Toxizität von PCM müssen mehrere Vorgänge in einem bestimmten Kontext stattfinden. Es muss zum einen die Sulfatisierungs- und Glucuronisierungskapazität voll ausgeschöpft sein, zum anderen muss eine vollständige GSH-Depletion vorliegen. Die daraus resultierende NAPQI-Akkumulation verursacht die Konjugation dieses Metaboliten an Proteine (43).

Es muss also erst ein gewisser Schwellenwert überschritten werden, bevor eine ausgeprägte Leberschädigung mit massiver Zellnekrose auftritt. Wird dieser überschritten, führt die Schädigung der Leber- und Gallengangszellen zu einer

intrahepatischen Akkumulation von toxischen Gallensäuren und Exkretionsprodukten, was die Schädigung noch zusätzlich verstärkt (37).

Die beobachtete Zunahme an oxidierten Intermediaten und der bereits beschriebene Verbrauch von Reduktionsäquivalenten durch NAPQI bedeuten eine Verschiebung des RedOx-Status in Richtung Oxidation. Dies lässt vermuten, dass die Hepatozyten bei einer PCM-Vergiftung oxidativem Stress ausgesetzt sind. In Zellkulturen ist es bekannt, dass oxidativer Stress an der Induktion von Nekrosen und massivem Zelluntergang beteiligt ist (7;38;39). Der genaue Mechanismus der PCM-induzierten hepatozellulären Nekrose ist letztlich jedoch noch unklar (30;43;46;51).

1.4 Therapeutische Ansätze

1.4.1 Behandlung mit Antidoten

Um eine schwerwiegende Dysfunktion und Leberschädigung zu vermeiden, wird nach einer PCM-Überdosis möglichst zeitnah ein Antidot verabreicht. Der Grundgedanke hierbei ist, den vollständigen Verbrauch des intrazellulären GLU-Pools zu verhindern bzw. diesen zu regenerieren und so die Menge des freien reaktiven Metabolits zu verringern.

Hierzu wäre die GSH-Substitution durch Infusion glutathionhaltiger Lösungen naheliegend. Trotz der intrahepatisch stattfindenden Neusynthese von GSH sind die Hepatozyten jedoch nicht dazu in der Lage, exogenes GSH aufzunehmen. Dieses wird renal abgebaut, als einzelne Aminosäuren wieder ins Blut abgegeben und auf diesem Weg anderen Organen zugänglich gemacht. Aufgrund der langen Zeitspanne zwischen Infusion und GSH-Anstieg liegt die Wirkung dieses Antidots nicht innerhalb des Therapiefensters und ist somit als ineffektiv zu betrachten (18;54;81).

Weiterhin wurden verschiedene Vorstufen von GLU auf ihre Wirksamkeit als Antidot getestet. Hierbei hat sich hinsichtlich der Wirksamkeit und der Verträglichkeit bei oraler und i. v. Gabe besonders das N-Acetylcystein (NAC) hervorgetan (18). Dessen positiver Einfluss auf den GLU-Stoffwechsel liegt vermutlich

an der intrazellulären Bereitstellung der Aminosäure Cystein, die in der GLU-Synthese aufgrund ihrer relativ geringen Konzentration normalerweise als limitierender Faktor angesehen werden kann (93).

Wie bereits angesprochen ist der ausschlaggebende Faktor für den therapeutischen Erfolg der rechtzeitige Beginn der Antidot-Gabe. Bei einem Beginn der NAC-Behandlung in den ersten 10 Stunden nach PCM-Einnahme kann die Behandlung als erfolgversprechend angesehen werden, wobei bereits zu einem Therapiebeginn nach 10-12 Stunden kontroverse Meinungen in der Literatur zu finden sind. Gegenstand der Diskussionen ist der hepatotoxische Effekt des Antidots selbst bei bereits bestehender Leberschädigung durch die PCM-Einnahme (81).

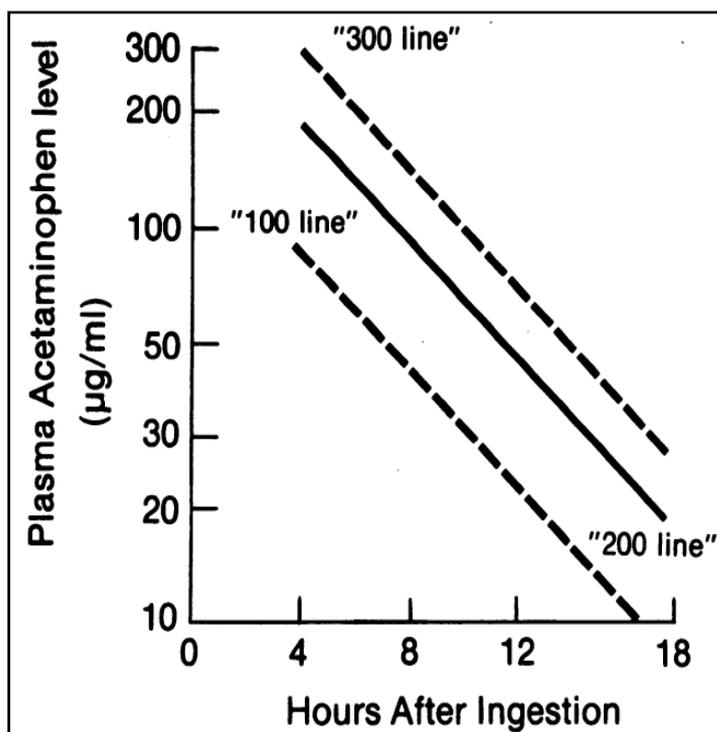


Abb.1.4: Rumack-Matthews-Nomogramm. Auftragung der Plasma-Paracetamolkonzentration (PPK) gegen die Zeit nach Einnahme (h). Liegt die PPK 4h nach Einnahme unter 100 µg/ml („100-Linie“), ist das Risiko eines Leberschadens gering. Bei Werten über 200 µg/ml („200-Linie“) geht man von einem 20%-igen Risiko für eine schwere Leberfunktionsstörung aus. Liegt die Konzentration über 300 µg/ml (300-Linie“) wird eine schwere Beeinträchtigung der Leberfunktion erwartet. Abbildung entnommen aus (81).

Bei einer Überdosierung in suicidalen Absicht gilt das Rumack-Matthews-Nomogramm als wichtige Hilfestellung für die Prognose und die Behandlung der Patienten (siehe Abb.1.4). Hierbei handelt es sich um die Auftragung der Plasma-Paracetamolkonzentration (PPK) gegen die Zeit nach PCM-Einnahme.

Liegt die PPK 4 Stunden nach Einnahme über 100 µg/ml wird eine NAC-Therapie empfohlen (17;81).

Bei unbeabsichtigter Überdosierung und bei Unklarheit bezüglich des Einnahmezeitpunktes findet das Rumack-Matthews-Nomogramm keine Anwendung. In diesen Fällen wird ab einer Dosis von 150 mg/kg Körpergewicht (KG) in den letzten 24 Stunden eine NAC-Therapie unter intensivmedizinischer Überwachung empfohlen (17;30).

1.4.2 Eliminierung toxischer Substanzen

Bei bereits bestehender Leberschädigung ist ein weiterer Therapieansatz, toxische Substanzen aus dem Blut zu entfernen. Dazu werden unterschiedliche Verfahren zu Hilfe genommen, die unter der Bezeichnung artifizielle Leberersatzverfahren (LEV) zusammengefasst werden.

Die häufigste Methode ist die *Hämodialyse*, bei der über eine semipermeable Membran relativ unspezifisch alle kleinen Moleküle ausgetauscht werden. Bei der *Hämofiltration* werden große Moleküle durch den Durchtritt durch eine Membran kontinuierlich entfernt. Weitere Möglichkeiten der Toxinentfernung sind die *Molekülabsorption* durch Aktivkohle, Kunstharze o. ä. und die *Plasmapherese*, bei der große Blutplasmamengen ausgetauscht werden, um die massive Koagulopathie zu korrigieren und Toxine und Cytokine zu entfernen. In neuester Zeit finden jedoch hauptsächlich Kombinationen dieser Methoden, wie die *Diabsorption* und die *Diafiltration*, in der Klinik Verwendung, da hier die effektivste Entgiftung stattfindet.

Insgesamt ist der Nutzen der Dialyse- und Filtrationsverfahren jedoch als eher fragwürdig anzusehen, da die Selektivität der Membranen sehr gering ist und somit sowohl proteingebundene Toxine als auch körpersuffiziente Stoffe entfernt werden. Außerdem findet zwar eventuell eine Nährstoff-Zufuhr statt, es ist jedoch keine Synthese leberspezifischer Stoffe möglich, weshalb diese Systeme hinsichtlich einer Verbesserung des Outcomes der Patienten kritisch betrachtet werden müssen (6).

Da die meisten Lebertoxine durch die Konjugation an Albumin entgiftet werden, ist es nahe liegend, ein extrakorporales LEV auf Basis einer Albumindialyse einzusetzen. Es wurden bereits viele solcher Systeme entwickelt, von denen zwei in der Klinik Verwendung finden (62).

Beim Prometheus® oder FPSA-System (fractioned plasma separation and adsorption system, Fresenius Medical Care) werden durch eine Protein-permeable Hohlfiltermembran aus Polysulfon die zellulären Blutbestandteile vom Plasma getrennt, welches anschließend über zwei Styroldivinylbenzol-Säulen und einem Anionen-Tauscher geleitet wird. Hierbei sollen Bilirubin, Gallensäuren und andere hydrophile, sowie an Albumin gebundene Toxine entfernt werden, bevor das Plasma wieder in den Patienten zurückgeleitet wird (79).

Das MARS® (molecular adsorbent recirculation system, Gambro) dialysiert ebenfalls durch eine Hohlfasermembran, welche albumingebundene Toxine passieren lässt (6;90). Die Dialysatlösung wird im Gegensatz zum Prometheus-system jedoch mit Albumin angereichert, um eine bessere Diffusion der gebundenen Toxine zu erreichen. Das Dialysat wird in einem zweiten Kreislauf durch zwei Absorptionssäulen (Aktivkohle und Anionentauscher) regeneriert (63). Der genaue Systemaufbau ist in Abb.1.5 zu sehen.

Prospektive Studien zeigen, dass sowohl das MARS, als auch das Prometheus positiv auf den klinischen Zustand und den Krankheitsverlauf des ALV einwirken (23;55;55;70). Dies gilt auch für die Therapie von pädiatrischen Patienten. Vor allem bei Kindern präsentiert sich das ALV oft erst sehr spät und mit unspezifischen Symptomen, häufig als Folge einer zugrundeliegenden metabolischen Störung, oder einer chronischen Lebererkrankung, so dass auch hier das Risiko eines Multiorganversagens nicht unerheblich ist (1;65). Auch in diesem Gebiet hat sich die MARS-Therapie sowohl für die perioperative Behandlung einer Lebertransplantation, als auch für das kurz- und langfristige Outcome der kleinen Patienten als vorteilhaft erwiesen (65).

Es kann jedoch keine der beschriebenen Therapien als kurativ angesehen werden. Sie können lediglich die Überbrückung der Leberinsuffizienz ermöglichen

und die Entstehung bzw. Progression eines zerebralen Ödems verhindern. So kann im besten Fall einige Zeit gewonnen werden, bis ein Spenderorgan für eine Lebertransplantation zur Verfügung steht, die Leber zu regenerieren beginnt und/oder eine Regression der Enzephalopathie beobachtet werden kann (2;6;12).

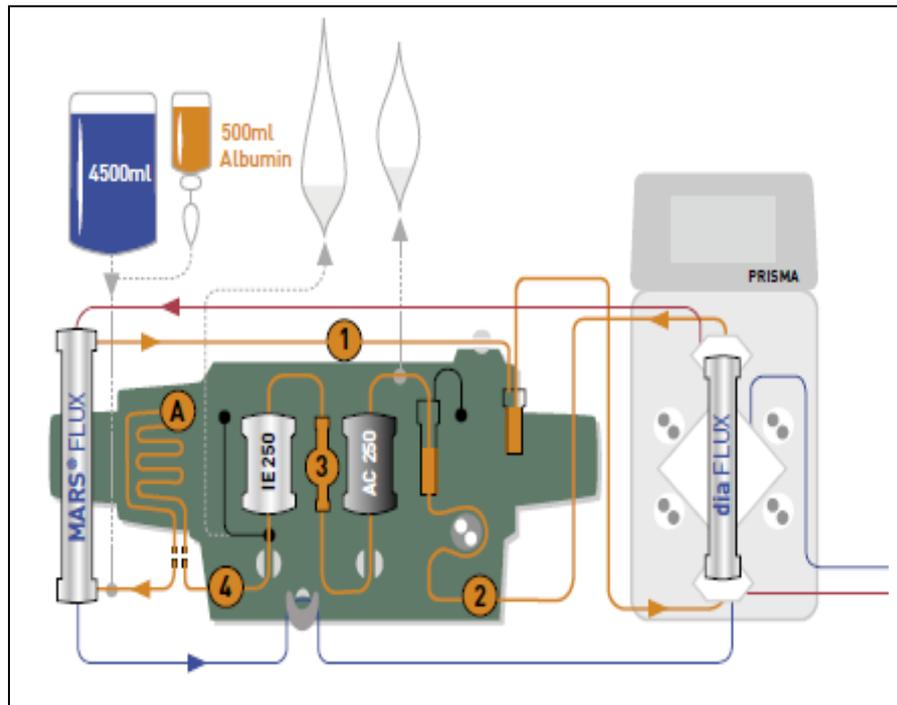


Abb.1.5: Systematischer Aufbau des MARS®-Gerätes. Abbildung entnommen aus der Produktbeschreibung des MARS® Behandlungssets.

In den neuesten Versuchen zur Behandlung des ALV wird das Ziel verfolgt, sich die Physiologie von Hepatozyten hinsichtlich ihrer hochselektiv entgiftenden Wirkung zunutze zu machen. Diese bioartifiziellen LEV schleusen im Gegensatz zu den artifiziellen, zellfreien Methoden Vollblut durch sog. Bioreaktoren, in welchen Hepatozyten extrakorporal kultiviert werden, um eine möglichst effiziente Entgiftung zu erreichen.

Dieses zukunftsweisende Behandlungskonzept zeigt in Versuchen an unterschiedlichen Tiermodellen große Erfolge und Varianten davon sind momentan Gegenstand klinischer Studien, deren Ergebnisse noch abzuwarten bleiben (20;57;82;89).

Es soll hier aller LEV zum Trotz jedoch nochmals erwähnt werden, dass eine orthotope Lebertransplantation nach wie vor die einzige kurative Therapie des ALV darstellt und der Mangel an verfügbaren Organen die Transplantation als Behandlungsmöglichkeit und somit auch die Behandelbarkeit des Krankheitsbildes des akuten Leberversagens stark limitiert (12).

1.5 Tiermodell

Um die Physiologie und Pathologie des ALV in ihrer ganzen Komplexität erfassen und erforschen zu können, ist ein suffizientes Tiermodell unabdingbar.

Die Anforderungen an ein ideales Tiermodell umfassen nach Definition von Terblanche und Hickman die Erfüllung von 6 Kriterien (siehe Tab.1.1) (83). In erster Linie müssen *potenzielle Reversibilität* des induzierten Leberversagens und *Reproduzierbarkeit des Leberschadens* gegeben sein. Der Tod eines Modelltieres muss mit dem in der Klinik beobachteten *Tod durch Leberversagen* vergleichbar sein. Zusätzlich muss vor Todeseintritt ein *ausreichendes Therapiefenster* vorhanden sein. Außerdem sollten die therapeutischen Maßnahmen, die beim Menschen Verwendung finden, auch im Tiermodell anwendbar sein. Aufgrund des Blutvolumens und der intensivmedizinischen Betreuung ist somit ein *Großtiermodell* zwingend. Wird das Leberversagen durch Toxine induziert, darf zu keiner Zeit eine *Personalgefährdung* vorliegen.

Hierbei wird jedoch außer Acht gelassen, dass noch 3 weitere Faktoren für das Gelingen einer experimentellen Studie essentiell sind. Beispielsweise sollte eine Tierart verwendet werden, die in *Metabolismus und Physiologie* dem Menschen möglichst ähnlich ist, jedoch sollte die Durchführung des Modells zu jeder Zeit *ethischen Grundsätzen und Tierschutz-Standards* entsprechen. Eine weitere Voraussetzung ist, dass die *explizite Fragestellung* der Studie durch das gewählte Modell beantwortet werden kann (25).

Trotz intensiver Forschung ist es bis dato noch nicht gelungen, das ideale Tiermodell, also die Erfüllung aller Kriterien mit einem einzigen Modell, für die Untersuchung des ALV zu etablieren. Es ist auch nicht nötig, allen wissenschaftli-

chen Anforderungen mit einem einzigen Modell gerecht zu werden. Vielmehr sollte für spezielle Anforderungen jeweils das Modell genutzt werden, das die geforderten Kriterien am Besten erfüllt (25).

Kriterien für ein ideales Tiermodell des Leberversagens:

1. Potentielle Reversibilität des Leberversagens
2. Reproduzierbarkeit des Krankheitsbildes
3. Tod des Tieres an den Folgen des Leberversagens
4. Vorhandensein eines therapeutischen Fensters
5. Großtiermodell
6. Möglichst geringe Gefährdung des Personals
7. Ähnlichkeit mit dem Menschen in Physiologie und Metabolismus
8. Respektieren von ethischen Grundsätzen und Tierschutz-Standards
9. Beantwortung der expliziten Fragestellung durch das Modell

Tab.1.1: Das ideale Tiermodell für die Erforschung des Leberversagens. Zusammenge- stellt aus (25;83).

Die Induktion eines Leberversagens (LV) durch chirurgische Maßnahmen, wie die totale Hepatektomie oder die hepatische Devaskularisierung, sind zwar in der Literatur beschrieben (68;76), scheitern aber als ideale Modelle. Das anhepatische Modell ist weder reversibel, noch zeigen sich die gewünschten Symptome, während die dauerhafte Devaskularisierung zwar zum Auftreten der klassischen Symptome führt, aber ebenso irreversibel ist (68). Aus diesem Grund beschäftigen sich die neueren Versuche mit dem Modell der vorübergehenden Ischämie, die durch eine zeitlich begrenzte Unterbindung der blutversorgenden Lebergefäße herbeigeführt wird. Erste Ergebnisse sind vielversprechend, es gilt jedoch noch den Beweis der Reproduzierbarkeit zu erbringen (68;89).

Auch auf dem Gebiet des toxininduzierten Leberversagens wurde bereits intensiv geforscht. Es ist eine Vielfalt hepatotoxischer Substanzen wie z.B. D-Galactosamin, Tetrachlorkohlenstoff, Thioacetamid und Concanavallin A be-

kannt (76), die jedoch zum Teil sehr teuer sind und eine potentielle Gefahr für das Personal darstellen.

Wie bereits dezidiert besprochen hat PCM ebenfalls eine leberschädigende Wirkung, ist jedoch zudem kostengünstig und im Umgang ungefährlich. Besonders aufgrund der klinischen Relevanz ist ein Modell mit dieser Substanz von besonderem Interesse. An Nagern sind entsprechende Modelle bereits etabliert. Da jedoch sowohl die Möglichkeiten zur Überwachung und zur Etablierung relevanter Therapien durch die Größe der Tiere stark begrenzt sind, als auch die Übertragbarkeit in die Klinik als fragwürdig anzusehen ist, wird besonders an einem zuverlässigen Modell mit Großtieren geforscht (25;76;77). Die unvorhersehbare Symptomatik, deren Behandlung und die mangelnde Reproduzierbarkeit führten jedoch bereits zum Scheitern vieler Arbeitsgruppen (32;89).

Tiermodelle sind besonders im Hinblick auf neue Einsichten und Erkenntnisse bezüglich der toxischen Wirkung von PCM und der klinischen Handhabbarkeit der Symptome bei einer Überdosierung von großer Bedeutung, da trotz einiger Bemühungen in der Vergangenheit das Zusammenspiel der unterschiedlichen Faktoren noch immer nicht gänzlich verstanden ist (43).

Um die Mechanismen der Toxizität weiter aufzuschlüsseln und die Entwicklung effizienter Therapien voranzutreiben, ist die Etablierung suffizienter Tiermodelle somit von hohem Interesse.

1.6 Fragestellung

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist zum Einen die Etablierung eines Modells zum PCM-induzierten akuten Leberversagen am Schwein als Organismus. Dem liegt der weiterführende Zweck zu Grunde, in einer klinischen Studie drei Varianten eines artifiziellen LEV gegen eine Kontrollgruppe zu untersuchen und valide Aussagen über deren Beitrag zum Krankheitsverlauf machen zu können. Zum Anderen soll an aus Studientieren gewonnenen Leberbiopsie-Proben der

GSH/GSSG-Gehalt bestimmt werden, um den oxidativen Stress in Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten des ALV zu erfassen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die Materialien, die zur Pflege und Behandlung der Tiere verwendet wurden, entsprechen denen einer Intensivstation in der Klinik. Speziell verwendete Materialien oder Geräte werden im Folgenden aufgeführt.

2.1.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten Schweine der deutschen Landrasse mit einem mittleren Gewicht von 34 ± 5 kg.

2.1.2 Überwachung

Folgende Geräte waren zu Therapie- und Diagnostikzwecken notwendig.

Beatmungsgerät	Kion SC 9000XL	Siemens
Überwachungssystem	IntelliVue MP50 Anesthesia	Philips
Blutgasanalysegerät	ABL 800 Flex	Radiometer

2.1.3 Einleitung und operative Eingriffe

Für Einleitung und Operation sowie für die Leberbiopsie wurden außer den in der Klinik üblichen Arbeitsmitteln folgende Utensilien verwendet.

Arterieller Katheter	Leader-Cath®; 4,5Fr/1,5mm; 25cm	VYGON
Blasen Katheter	Absaugkatheter 14CH	Tyco Healthcare
Darmkatheter	Absaugkatheter 14 CH	Tyco Healthcare
Elektrisches Messer	Erbotom T 400 C	Erbe
Magensonde	Kendall Argyle™, Saugerschlauch	Tyco Healthcare
Temperatursonde	IntelliVue	Philips
Zentralvenöser Shaldon-Katheter	Blue FlexTip®	Arrow int.

2.1.4 Medikamente und Infusionen

Die folgenden Medikamente und Infusionen waren zur Therapie der Tiere nötig.

Atropinsulfat 0,5 mg/ml		Köhler Chemie
Azaperon 4%	Stresnil®	Janssen
Calciumchlorid 5,5%	CaCl	Baxter
Ceftriaxon 2g	Ceftriaxon-Hexal®	Hexal
Erythrozytenkonzentrat	EK (ca. 300ml / Einheit)	
Fentanylcitrat 50 µg/ml	Fentanyl-ratiopharm®	Ratiopharm
Fresh frozen plasma	FFP (ca. 300ml / Einheit)	
Furosemid-Natrium, 10 mg/ml	Lasix®	Aventis
Glukose-Monohydrat 20%	G20 Glukosteril®	Fresenius Kabi
Heparin-Natrium 10.000 I.E./ml	Heparin-Natrium Braun „Multi“	B.Braun
HydroxyethylstärkeLösung 6%	Voluven® (500ml / Einheit)	Fresenius Kabi
Kaliumchlorid-Lösung 1M	KCl	Baxter
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ursotamin®	Serumwerk Bernburg
Magnesiumbis(hydrogen-l-glutamat)	Magnesium Verla®	Verla
Midazolamhydrochlorid 5 mg/ml	Midazolam-ratiopharm®	Ratiopharm
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Fresenius Kabi
Natriumhydrogenkarbonat 8,4%	NaBic®	B.Braun
Norepinephrin 1 mg/ml	Arterenol®	Sanofi-Aventis
Paracetamol 500mg Tbl.	Paracetamol-ratiopharm® 500	Ratiopharm
Paracetamol-Lösung 40 mg/ml	Paracetamol-ratiopharm® Lösung	Ratiopharm
Propofol 1%	Propofol- Fresenius	Fresenius Kabi

2.1.5 MARS-Therapie

Für die MARS-Therapien wurden die im Folgenden aufgeführten Geräte, Materialien und Infusionen benötigt. Die Behandlungssets und Filter der MARS-Varianten A, B und C können hier aus patentrechtlichen Gründen nicht näher beschrieben werden.

Dialysatlösung	Haemosol/BO	Hospal
extrakorporale Blutpumpe	Prisma CFM	Hospal
Glucose-Monohydrat 5%	G5 Glucosteril®	Fresenius Kabi
MARS® Monitor		Gambro
MARS® Behandlungsset inklusive aller benötigten Filter		Gambro
N-Acetylcystein 20%	Fluimucil®	Zambon

2.1.6 Glutathionbestimmung

Die zur Glutathionbestimmung notwendigen Reaktionslösungen wurden wie folgt hergestellt. Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden die Chemikalien von Sigma-Aldrich bezogen.

<u>Phosphat-EDTA-Puffer</u>	100 mM Na ₃ PO ₄ 1 mM EDTA auf pH 7.4 einstellen	
<u>2-Vinylpyridin-Lösung</u>	260 µl 2-Vinylpyridin in 5 ml Phosphat-EDTA-Puffer	
<u>5% Sulfosalicylsäure (SSA)</u>	2,5g Sulfosalicylsäure in 50 ml dest. H ₂ O	
<u>Glutathionreduktaselösung</u>	407 µl Glutathionreduktase 35 mg NADPH in 100 ml Phosphat-EDTA-Puffer	A6334 N1630
<u>Glutathionreduktase-Färbelösung</u>	9 mg 5´5´-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) in 5 ml Phosphat-EDTA-Puffer	
<u>100 µM GSH-Standard</u>	6,1 mg GSH in 10 ml 1% SSA 1:20 Verdünnung in 1% SSA, aliquotieren	
<u>50 µM GSSG-Standard</u>	6,1 mg GSSG in 10 ml 1% SSA 1:20 Verdünnung in 1% SSA, aliquotieren	

2.1.7 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung diente die Methode nach Bradford. Die Reagenzien wurden wie folgt hergestellt.

<u>Stammlösung</u>	100 mg Coomassie Blue G	
	50 ml Ethanol 99%	Merck
	100 ml Phosphorsäure 85%	Merck
	auf 250 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	
<u>Bradfordreagenz</u>	Stammlösung 1:4 mit dest. H ₂ O verdünnen	
<u>Standard 100 µg/ml</u>	10 mg BSA Fraktion V	
	In 10 ml dest. H ₂ O	
	Herstellung einer 1:10 Verdünnungsreihe	

2.1.8 NAD/NADH-Bestimmung

Die NAD/NADH-Bestimmung wurde unter Verwendung folgender Reagenzien durchgeführt.

<u>NAD Extraktionspuffer</u>	800 µl 1 M HCl	Merck
	in 80 ml dest. H ₂ O	
<u>NADH Extraktionspuffer</u>	800µl 1 M NaOH	Merck
	in 80 ml dest. H ₂ O	
<u>NAD/NADH Reaktionspuffer</u>	3 g Tris-Base	
	100 µl BSA Fraktion V	
	auf 100 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	
	auf pH 8.8 einstellen	
<u>0,5% PMS-Lösung</u>	30 mg Phenazinmethosulfat (PMS)	
	in 6 ml dest. H ₂ O	
<u>0,5% MTT-Lösung</u>	30 mg Thiazolyl-Blau Tetrazoliumbromid (MTT)	
	in 6 ml dest. H ₂ O	
<u>1% Ethanolösung</u>	1 ml Ethanol 96%	Merck
	in 99 ml dest. H ₂ O	

<u>NAD/NADH Reaktionslösung</u>	7,5 ml NAD/NADH Reaktionspuffer 750 µl Alkoholdehydrogenase (560U/ml) 750 µl 1% Ethanollösung 270 µl 0,5% PMS-Lösung 270 µl 0,5% MTT-Lösung
<u>10 µM NAD-Standard</u>	132,6 mg NAD-Natriumsalz in 10 ml dest. H ₂ O entspricht 40mM 1:40 mit anschließender 1:10 Verdünnung in dest. H ₂ O aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.9 Geräte

Ultraschallstab	Sonifier Cell Disruptor	B15 Branson
Ultrafuge	Mikro 22R; Radius 150mm	Hettich Zentrifugen
ELISA-Reader	Multiskan Ascent	ThermoElectron-Corp.
ELISA-Schüttler	EASIA Shaker	Medgenix Diagnostics

2.1.10 Programme

Photometrische Bestimmung	Ascent Software Version 2.6	Thermo Labsystems
Diagramme	Origin 6.0	Microcal Software
Statistik	Jump 6.0	SAS Institute
Bildbearbeitung	Corel DRAW12	Corel Corporation
Strukturformeln; Reaktionsschemata	ISIS DRAW 2.5	MDL Information Systems

2.1.11 Messwerte und Darstellung

Falls nicht anders indiziert sind die Messwerte im Folgenden in Form von Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SF) dargestellt. Die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zu einem Kontrollwert wurde mittels des Programms Jump 6.0 und anhand des Dunnett's Tests durchgeführt.

2.2 Methode

2.2.1 Tiermodell

2.2.1.1 Tiere, Versuchsvorbereitung und Induktion des Leberversagens

Die Genehmigung der im Folgenden beschriebenen Studie wurde bei der zuständigen Stelle des Regierungspräsidiums Tübingen beantragt und von dieser genehmigt. Der allgemeine Umgang und die medizinische Behandlung der Tiere erfolgte zu jeder Zeit unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen.

Es wurde an männlichen und weiblichen Schweinen ein akutes Leberversagen durch die Gabe eines PCM-Bolus mit anschließender Erhaltung eines Plasma-Spiegels induziert. Die angestrebte Plasma-Paracetamolkonzentration (PPK) lag zwischen 300 und 450 mg/l. Zeitpunkt des LV und somit auch Behandlungsbeginn waren definitionsgemäß bei einer INR > 1,5 erreicht (54;74).

Die Tiere wurden vor Beginn der Prozedur unter Standardbedingungen aufgestellt und 24 Stunden vor Intoxikation nüchtern gehalten. Nach Prämedikation mit Atropinsulfat (0,05 mg/kg KG i. m.) und Azaperon (3 mg/kg KG i. m.) wurde ein peripherer Venenverweilkatheter in eine Ohrvene verbracht. Die Einleitung erfolgte durch Gabe eines Propofol-Bolus (1-1,3 mg/kg KG i. v.), woraufhin umgehend die orotracheale Intubation (Tubus Größe 7,5) und das Legen einer Magensonde durch einen Veterinärmediziner durchgeführt wurden. Anschließend wurde das Tier auf dem Rücken liegend auf einem OP-Tisch fixiert, bei dem zuvor eine Aussparung für die Ohren ausgesägt worden war. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte aufgrund des geringen Gewichtsunterschiedes der Tiere durch eine intravenöse Standard-Kombinationsnarkose von Fentanyl (500 µg/h), Midazolam (50 mg/h) und Ketamin (500 mg/h) über eine Spritzenpumpe. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Tiere druckkontrolliert mit einem Luft/O₂-Gemisch beatmet. Danach wurden die Halsgefäße frei präpariert, ein arterieller Katheter einseitig in die Arteria Carotis interna und jeweils ein dreilumiger Sheldon-Katheter in die Vena Jugularis externa rechts und links verbracht. Der arterielle Zugang wurde an ein Druckmodul angeschlossen, um Blutdruck, arteriellen Mitteldruck (MAP) bestimmen und Blutentnahmen durch-

führen zu können. Die zentralen Venenkatheter dienen der Messung des zentralvenösen Drucks (ZVD), der kontinuierlichen Aufrechterhaltung der Narkose, der i. v. Flüssigkeits- und Medikamentensubstitution, sowie als Anschluss für das Dialysegerät. Anschließend wurde durch eine mediane Laparotomie das Abdomen eröffnet, die Lage der Magensonde durch Ertasten korrigiert, ein Dauerkatheter in die Blase verbracht, eine Darmsonde im proximalen Jejunum positioniert und der Bauchraum wieder verschlossen (siehe Abb.2.1).



Abb.2.1: Lagerung und Fixierung eines Studenschweines nach dem operativen Eingriff

Die Induktion des Leberversagens erfolgte durch einen initialen Bolus von 0,25 g/kg KG PCM mit einer anschließenden Erhaltungsdosis von 2 g/h. Der Bolus wurde in 50 ml, die Erhaltungsdosen in jeweils 10 ml Wasser gelöst und über die Darmsonde verabreicht. Der PCM-Gehalt des Blutes (PPK) wurde mindestens alle 4 Stunden sowie zusätzlich bei Bedarf durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen (UKT) bestimmt und die Erhaltungsdosis dementsprechend variiert. Lag der Spiegel 12 Stunden nach Bolusgabe unter 300

mg/l, wurde die Erhaltungsdosis auf 3 g/h erhöht. Stieg der Spiegel über 450 mg/l oder fiel bei der Blutgasanalyse (BGA) eine starke Vermehrung der Methämoglobinkonzentration (MetHb) auf, wurde die Erhaltungsdosis auf 1 g/h reduziert oder ganz ausgesetzt bis die Parameter regeneriert waren. Ganz eingestellt wurde die PCM-Applikation bei einer INR > 1,5, da per Definition ein ALV erreicht war.

2.2.1.2 Intensivmedizinische Überwachung

Das Monitoring erfolgte anhand von Elektrokardiogramm (EKG), Herzfrequenz (HF), arteriellem Mitteldruck (MAP), zentralvenösem Druck (ZVD), Ausscheidung und rektaler Temperatur, sowie der Beatmungsparameter PIP (inspiratorischer Spitzendruck), PEEP (positiver endexpiratorischer Druck), der peripheren Sauerstoffsättigung (SpO₂) und der Sauerstoffkonzentration im Beatmungs-gemisch (FiO₂). Eine Blutgasanalyse (BGA) wurde stündlich und zusätzlich bei Bedarf mit arteriellem Blut durchgeführt, individuell interpretiert und die Betreuung der Tiere hinsichtlich Beatmungs- und Infusionsmodalitäten entsprechend optimiert. So wurden pH-Wert-Veränderungen bei Bedarf umgehend durch Natrium-Bicarbonat (NaBic) gepuffert und Elektrolyt-Entgleisungen (Kalium, Natrium, Calcium) bei Bedarf medikamentös korrigiert. Routinemäßig wurden vor Intoxikation und anschließend um 16, 24 und 8 Uhr die Blutparameter Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hk), Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Gesamteiweiß, Albumin, Bilirubin direkt, Bilirubin gesamt, GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), LDH (Laktatdehydrogenase), AP (Alkalische Phosphatase), GGT (Gamma-Glutamyl-Transferase bzw. Glutamyl-Cystein-Synthetase), Kreatinin und Harnstoff einschließlich des Ammoniakgehalts im Zentrallabor des UKT labor-technisch bestimmt. Die INR, die partielle Thromboplastinzeit (PTT) und die PPK wurden alle 4 Stunden und zusätzlich bei Bedarf durch das Zentrallabor festgestellt.

Die Volumenersatztherapie erfolgte durch Infusion von 0,9% Kochsalzlösung und 6% Hydroxyethylstärke-lösung (HAES, Voluven). Bei einem Hb unter 6 g/dl wurden Erythrozytenkonzentrate (EK) aus Schweineblut substituiert. Die Auf-

rechterhaltung des MAP von 50-70 mmHg wurde bei Bedarf durch die Gabe von Norepinephrin (Arterenol®) gewährleistet. Als Sepsisprophylaxe erfolgte alle 24 Stunden eine i. v. Antibiose (Ceftriaxon 2g).

Durch intrakranielle Platzierung zweier Hirnsonden konnten bei 21 Tieren zusätzlich der intrakranielle Druck (ICP), sowie die Temperatur und der Sauerstoffpartialdruck im Hirnparenchym erfasst werden. Standardmäßig wurde bei allen Studientieren außerdem ein Elektroenzephalogramm (EEG) abgeleitet.

2.2.1.3 Gewinnung der Schweineblutkonserven

Bei der Schweine-Schlachtung eines nahe gelegenen Schlachthofes wurde die Halsschlagader der Tiere eröffnet, das heraus strömende Blut mit einem sterilen Trichter aufgefangen und durch ein Schlauchsystem in einen Citrat-antikoagulierten Transfusionsbeutel (500 ml) geleitet.

Nachdem dieser im Anschluss für 20 min bei 2500 G zentrifugiert wurde, folgte die Abtrennung des Plasmas, welches zur Gewinnung einer Fresh frozen Plasma-Einheit (FFP) sofort bei -80° C schockgefroren und gelagert wurde. Das erhaltene EK wurde bis zur Transfusion im Kühlschrank gelagert.

2.2.1.4 Entnahme von Lebergewebe

Vor Intoxikation, danach alle 24 Stunden und bei Exitus wurde eine Leberbiopsie gewonnen. Hierfür wurde der Bauchraum wieder eröffnet und unilateral eine Keilbiopsie der Leber entnommen. Anschließend wurde die Blutung durch elektrische Koagulation zum Stehen gebracht und das Abdomen wieder mit einer Naht verschlossen. Das so gewonnene Gewebe wurde umgehend in flüssigem Stickstoff konserviert. Zusätzlich wurden alle 8 Stunden Serum- und Plasma-proben aus arteriellem Blut gewonnen und bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 Studiengruppierung und Therapie

Die 28 Studientiere wurden durch Blockrandomisierung in 4 Therapiegruppen eingeteilt. Die jeweilige Gruppenzugehörigkeit wurde jeweils erst bei labortechnischem Nachweis einer INR > 1,5 bekannt gegeben. Alle Tiere erfuhren dieselbe intensivmedizinische Betreuung, die Behandlung unterschied sich ledig-

lich in den jeweiligen Therapien im LV. Im Folgenden sollen die therapeutischen Maßnahmen erörtert werden.

Den Tieren der Kontrolltiergruppe wurden ab Eintritt des ALV FFPs infundiert. Die Tiere der Gruppen der MARS-Variante A und MARS-Variante B erhielten in den ersten 2 Stunden nach Eintritt des LV je 3 FFPs und anschließend die jeweilige 6-stündige MARS-Therapie. Die Schweine der MARS-Variante C-Gruppe wurden mit einer Kombination aus NAC-Gabe und Dialysezyklus therapiert (siehe Abb.2.2 **A**). Die Antidot-Gabe erfolgte nach einem 3-phasigen Schema. Phase 1 beinhaltete die Infusion von 150 mg/kg KG NAC in 200 ml 5% Glucoselösung (G5) innerhalb der ersten 15 Minuten nach Eintritt des LV, gefolgt von 50 mg/kg KG NAC in 500 ml G5 über die folgenden 4 Stunden. Die Phase 3 verlangte dann die Applikation von 100 mg/kg KG in 1000 ml G5 während der darauf folgenden 16 Stunden. Zusätzlich wurden auch den Tieren dieser Therapiegruppe innerhalb der ersten 2 Stunden 3 FFP-Einheiten verabreicht und die MARS-Therapie mit Beendigung der 2. Phase begonnen (siehe Abb.2.2 **B**).

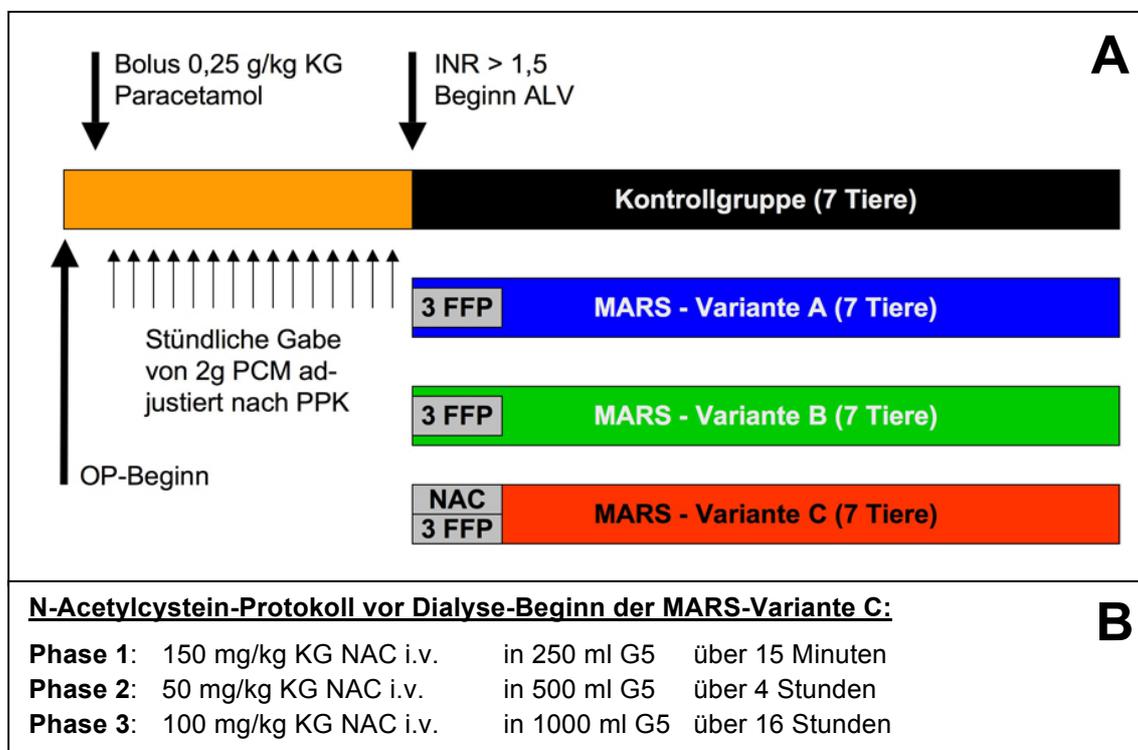


Abb.2.2: Übersicht über die Behandlung der Tiere. A: Schema zur Induktion des akuten Leberversagens und Therapiebeginn. **B:** N-Acetylcystein-Protokoll der MARS-Variante C.

Die MARS-Therapien wurden mit einer Blutflussrate von 55-100 ml/min und einer Dialysatflussrate von 250 ml/min durchgeführt. Ein zweiter Therapiezyklus wurde im Falle des Überlebens bei allen Tieren 24 Stunden nach Beginn der ersten MARS-Therapie durchgeführt.

2.2.1.6 Aufbereitung der Stickstoffproben

2.2.1.6.1 Glutathion- und Proteinbestimmung

Die in Flüssigstickstoff gelagerten Gewebeproben wurden portioniert und ausgewogen, wobei eine Auswaage zwischen 25 und 30 mg akzeptiert wurde. Anschließend wurden die Proben in 500 µl eiskalten Phosphat-EDTA-Puffer überführt und anhand eines Ultraschallstabes 1 Minute lang unter Kühlung zerkleinert.

Zur Proteinbestimmung wurde diesem Lysat ein Teil entnommen, eine 1:100 Verdünnung in PBS hergestellt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Zur GLU-Bestimmung musste zunächst eine Proteinfällung erreicht werden indem zu 100 µl dieses Lysats 50 µl eiskalte 5% SSA zugegeben wurde. Fortfolgend wurde gemischt und für 5 Minuten mit 9450 G und bei 4°C zentrifugiert. 50 µl des erhaltenen Überstandes wurden zu 50 µl Phosphat-EDTA-Puffer hinzugegeben, gemischt und bis auf Weiteres auf Eis gelagert.

2.2.1.6.2 NAD/NADH-Bestimmung

Da NAD und NADH getrennt bestimmt werden mussten, wurden aus einer Biopsieprobe jeweils zwei Gewebestücke entnommen und ausgewogen. Toleriert wurde hier ein Gewicht von 15-20 mg. Die Gewebestücke wurden jeweils in 100 µl eiskalten NAD- bzw. NADH-Extraktionspuffer transferiert und anschließend für 60 Sekunden unter Kühlung mit dem Ultraschallstab lysiert. Das Gewebelysat wurde dann für 5 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 100 µl gegensätzlichem Extraktionspuffer und 50 µl NAD/NADH Reaktionspuffer versetzt um den korrekten pH-Wert zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Proben gründlich gemischt, für 10 Minuten mit 33 000 G und bei 4°C zentrifugiert und anschließend bis zur Messung auf Eis gelagert.

2.2.2 Messmethoden und Bestimmung

2.2.2.1 Methode zur Glutathionbestimmung

Die Grundlagen der Konzentrationsbestimmung von GLU und GSSG entsprechen der Methode von Tietze. Hierbei handelt es sich um die Reduktion von 5'5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) durch GLU zu 2-Nitro-5-Thiobenzoensäure, welches bei einer Wellenlänge von 412 nm absorbiert (84). Der durch diese Reaktion erzeugte Farbumschlag ist proportional zur GLU-Konzentration. Die Nachweisgrenze dieser Methode wurde von Griffith durch die Zugabe der Glutathionreduktase, welche die enzymatische Regeneration von GLU katalysiert, noch verfeinert (siehe Abb.2.3) (27).

Zur Erfassung des GSSG-Gehalts muss im Vorfeld GSH aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Dies erfolgt durch das Maskierungsreagenz 2-Vinylpyridin. Der Vorteil dieses Reagenz ist die zuverlässige Derivatisierung GSH, wobei es die enzymatische Reaktion nicht beeinträchtigt (84).

Die Methode wurde hinsichtlich beschriebener Konzentrationen und Reaktionszeiten verändert. Die verwendeten Reagenzien sind unter 2.1.4. beschrieben.

Die Optimierung der Reaktionszeiten, des Messintervalls und der Nachweisgrenzen wurde anhand der Messung von Standardverdünnungsreihen erreicht.

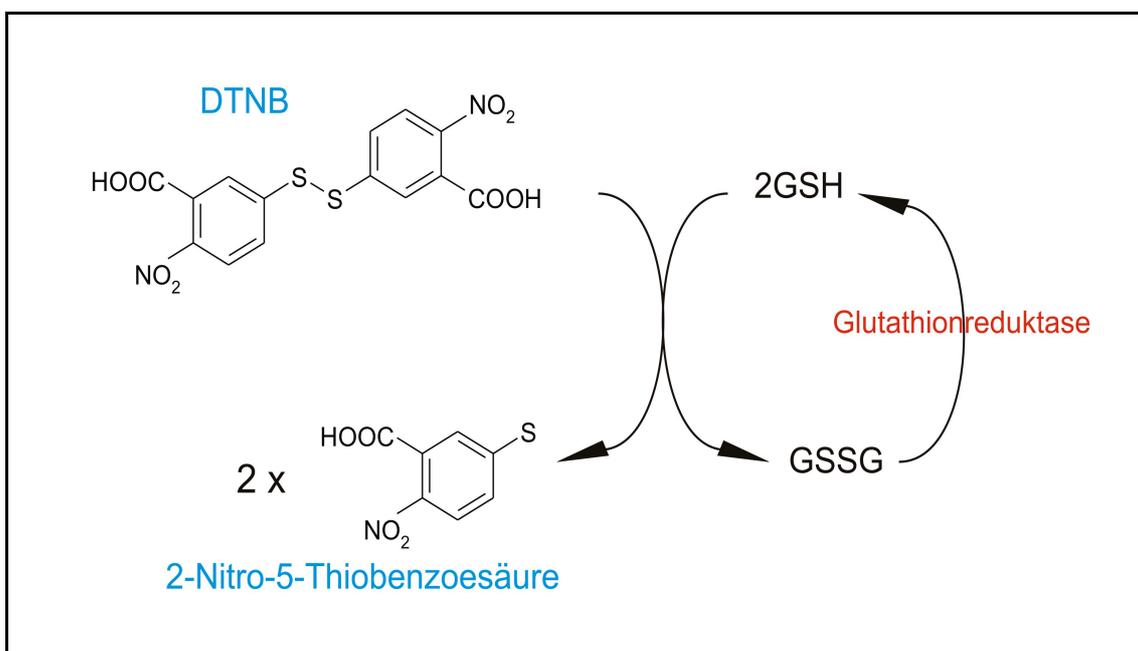


Abb.2.3: Reaktionsschema der Glutathionbestimmung.

2.2.2.2 Messung der Glutathionkonzentration

2.2.2.2.1 Totales Glutathion

Zur Bestimmung des totalen GLU-Gehaltes wurden 20 µl der unter 2.2.1.5.1 erhaltenen Überstände entnommen, mit 150 µl Glutathionreduktaselösung versetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Glutathionreduktase-Färbelösung hinzugesetzt und die Proben für 10 Minuten kinetisch bei 405 nm gegen eine Standardreihe vermessen.

2.2.2.2.2 Oxidiertes Glutathion

Für die Messung des GSSG-Gehalts wurden 20 µl der unter 2.2.1.5.1 erhaltenen Überstände mit 5 µl 2-Vinylpyridinlösung versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde den Proben 150 µl Glutathionreduktaselösung beigefügt, für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und dann mit 20 µl Glutathionreduktase-Färbelösung versetzt. Es wurde dann für 40 Minuten die Kinetik der Farbreaktion bei 405 nm vermessen.

2.2.2.3 Proteinbestimmung

Unter Verwendung der Bradfordmethode wurde die unter 2.2.1.5.1 hergestellte Lysatverdünnung auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Dazu wurden 50 µl der Proben mit 200 µl Bradfordreagenz versetzt und 5 Minuten unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 595 nm photometrisch gegen eine Standardreihe vermessen.

2.2.2.4 Messung der NAD/NADH-Konzentration

Die Vorgehensweise der NAD- bzw. NADH-Konzentrationsbestimmung entsprach der Anleitung des EnzyChrom NAD/NADH Analyse-Kits. Die Herstellung der Reagenzien und die Probenvorbereitung wurde bereits angesprochen, entsprach aber den empfohlenen Konzentrationen und Aufarbeitungsschritten des Test-Systems. Zur Messung der NAD- bzw. NADH-Konzentration wurden 40 µl der unter 2.2.1.5.2 vorbereiteten Proben mit 75 µl NAD/NADH Reaktionslösung versetzt und die Absorption bei 570 nm kinetisch vermessen.

3 Ergebnisse

3.1 Tiermodell

3.1.1 Etablierung des Modells, Dosisfindung

Zur Etablierung eines Großtiermodells des toxininduzierten ALV wurde Schweinen unter intensivmedizinischer Überwachung PCM verabreicht, wobei versucht wurde, den Kriterien eines idealen Großtiermodells (siehe Tab.1.1) möglichst gerecht zu werden. Definierend für den Eintritt des LV wurde eine INR $> 1,5$ angesehen, da laut aktueller Literatur ein Anstieg der INR über 1,5 und das Auftreten einer Enzephalopathie die deutlichsten Symptome eines ALV sind (54;74). Die Daten des Neuromonitorings waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit und sollen im Folgenden außer Acht gelassen werden.

Für ein reproduzierbares Modell, bei dem sowohl verlässlich ein LV induziert wird, als auch ein für die Therapie ausreichendes therapeutisches Fenster gegeben ist, musste zunächst die entsprechende PCM-Dosis gefunden werden.

Zunächst wurde 7 Tieren eine Dosis von 1 g/kg KG appliziert. Es war jedoch nur bei 3 Tieren ein LV nachweisbar und Grund des Sterbens. Ein Schwein wies ein Gesamtüberleben ab Vergiftung von 5 Stunden auf. Die anderen 3 Tiere zeigten eine Regeneration der INR, woraufhin die Dosis gesteigert wurde.

Um eine höhere Lebertoxizität zu erreichen, wurde bei 2 Tieren zur Induktion von Cytochrom P450 2E1 innerhalb von 24 Stunden vor Vergiftung insgesamt 2 g/kg KG Isopropanol kontinuierlich über die Darmsonde verabreicht (51). Beide Tiere zeigten hinsichtlich der PCM-Toxizität keine gesteigerte Empfindlichkeit und auch keine Anzeichen eines ALV.

Die Verabreichung von 1,5 g/kg KG PCM, von 1,25 g/kg KG und ein einmaliger Bolus von 0,5 g/kg KG mit anschließender Erhaltungsdosis von 2 g/h ergaben ebenfalls keine befriedigenden Ergebnisse. Ein ALV wurde aufgrund verfrühten Sterbens bei allen Vergiftungsschemata nicht bzw. nicht ausreichend lang erreicht, was in der Folge zu einer Senkung der Dosis führte.

Zwei weiteren Tieren wurde jeweils ein Bolus von 0,5 g/kg KG und nach 24 Stunden ein weiterer Bolus von 1 g/kg KG verabreicht, wobei kein ALV erreicht wurde. Beide Tiere wurden euthanasiert.

Die nun folgenden Versuchstiere erhielten je eine Einmalgabe von 0,25 g/kg KG und bis auf Weiteres eine Erhaltungsdosis von 2 g/h in Form von PCM-Saft kontinuierlich über eine Spritzenpumpe. Diese Methode erwies sich als komplikationsreich, da einige Tiere Durchfälle entwickelten und die Resorption von PCM ins Blut nicht gewährleistet schien. Daraufhin wurde auch die Erhaltungsdosis in Form von gelösten Tabletten verabreicht.

Die engmaschige Überwachung der PPK ergab nun hinsichtlich der geforderten Kriterien einen optimalen Bereich von 300-450 mg/l, der durch entsprechende Variierung der stündlichen PCM-Dosis eingehalten wurde.

Bei hohen Vergiftungsdosen fiel auch eine steigende MetHb-Konzentration auf, die zu therapeutischen Schwierigkeiten führte. Bei einer Erhöhung über 10% wurde deshalb die PCM-Dosis erniedrigt oder ausgesetzt, bis die MetHb-Konzentration rückläufig war. Ganz abgesetzt wurde die Gabe bei einer INR > 1,5, da hier das Leberversagen *per definitionem* erreicht war.

Bei Einhaltung dieses Schemas starben die Tiere den Modellkriterien entsprechend an einem Multiorganversagen und/oder einem zerebralen Ödem, also an den Folgen des ALV.

3.1.2 Entwicklung der Parameter

Das o. g. Intoxikationsmodell stellte nun die Grundlage für die Studie dar, in welcher 28 Tiere in 4 Gruppen unterteilt und hinsichtlich der Beiträge der verschiedenen MARS-Therapien zum Allgemeinzustand (AZ) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht wurden.

3.1.2.1 Intensivmedizinische Parameter

Die hämodynamische Situation verschlechterte sich bei allen Tieren mit fortschreitendem Krankheitsverlauf. Besonders auffallend waren die Veränderungen ab ca. 10 Stunden vor Eintritt des LV. Die HF stieg sprunghaft an und war außerdem weitaus instabiler als vor Intoxikation, was auf eine erhöhte Noradrenalin-Gabe zurückzuführen war, während der MAP trotz Volumensubstitution kontinuierlich absank (siehe Abb.3.1).

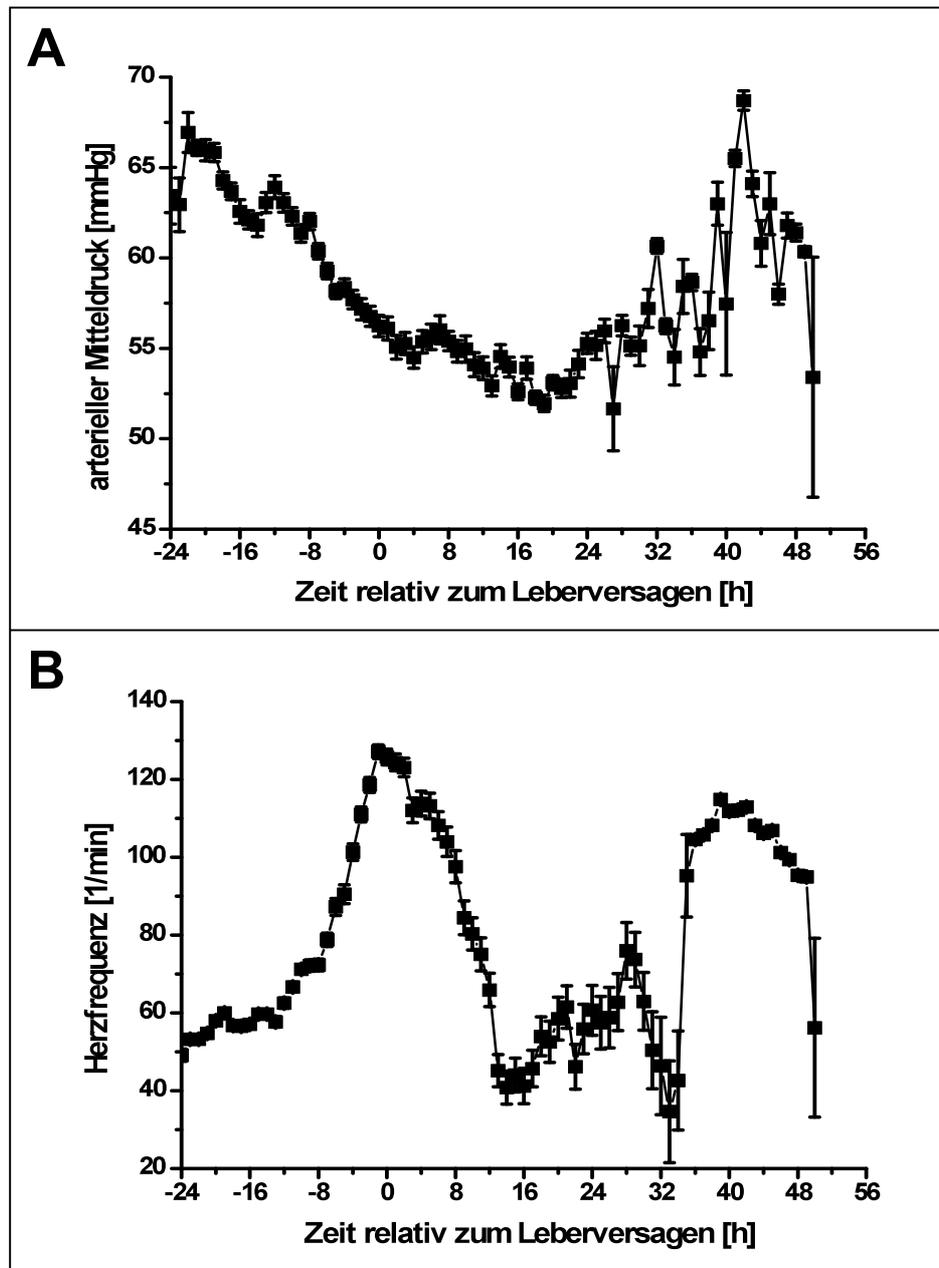


Abb.3.1: Intensivmedizinische Parameter relativ zum Leberversagen. Von allen Tieren wurden die jeweiligen Mittelwerte über Intervalle von einer Stunde ermittelt und gegen die Zeit relativ zum Leberversagen (LV) abgetragen. Der indizierte Fehler entspricht dem SF, 0 = Beginn des ALV. **A:** arterieller Mitteldruck **B:** Herzfrequenz

Die Beatmung der einzelnen Tiere wurde nach Beurteilung des klinischen Zustandes und nach Interpretation der jeweiligen BGA hinsichtlich des Oxygenierungszustandes und anderer Parameter individuell verändert und optimiert. Die über den Zeitraum von einer Stunde gemittelten Werte der Parameter FiO_2 und SpO_2 zeigten eine gegenläufige Entwicklung (siehe Abb.3.2).

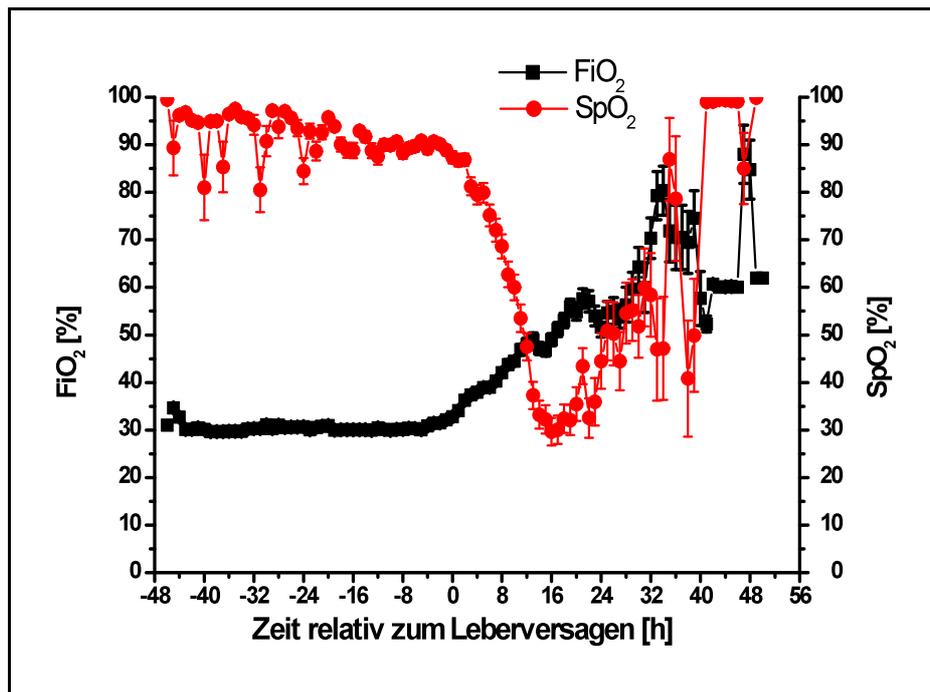


Abb.3.2: Die O₂-Konzentration im Beatmungsgemisch (FiO₂) und die periphere Sauerstoffsättigung (SpO₂) relativ zum Leberversagen. Die jeweiligen Mittelwerte aus einer Stunde beider Parameter wurden für alle Tiere mit indiziertem SF gegen die Zeit relativ zum Leberversagen aufgetragen. 0 = Beginn des ALV.

Betrachtet man die Beatmungsdrücke PIP und PEEP, nahmen diese über die gesamte Überlebenszeit, besonders aber über die Zeit des LV deutlich zu (siehe Abb.3.3), was auf eine ödematöse Veränderung und Schädigung der Lunge hinweisen könnte.

3.1.2.2 Laborparameter im Blut

Ziel des Vergiftungsschemas war das Erreichen einer PPK von 300-450 mg/l innerhalb von 12 Stunden und einem Erhalt auf diesem Niveau bis zum Ansteigen der INR über 1,5. Die Mittelwerte der gemessenen PPK für 8 und 16 Stunden nach Vergiftung ergaben Werte von 293 ± 80 mg/l und 389 ± 89 mg/l und lagen somit im gewünschten Bereich. Eine INR > 1,5 konnte im Mittel innerhalb von 28 ± 7 Stunden gemessen werden.

Die vergleichende Betrachtung der PPK und der INR zeigt eine eindeutige Korrelation zwischen Leberfunktion und PPK (siehe Abb.3.4).

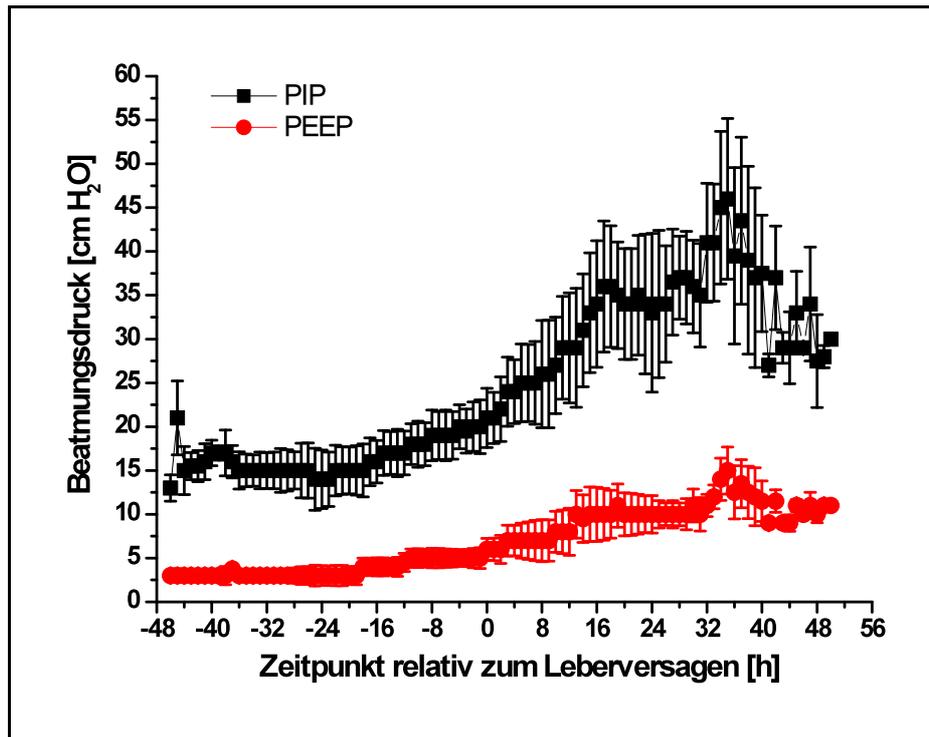


Abb.3.3: Die Beatmungsparameter PIP und PEEP relativ zum LV. Aus dem Intervall von einer Stunde wurden MW \pm S beider Parameter für alle Tiere aufgetragen. 0 = Beginn des ALV.

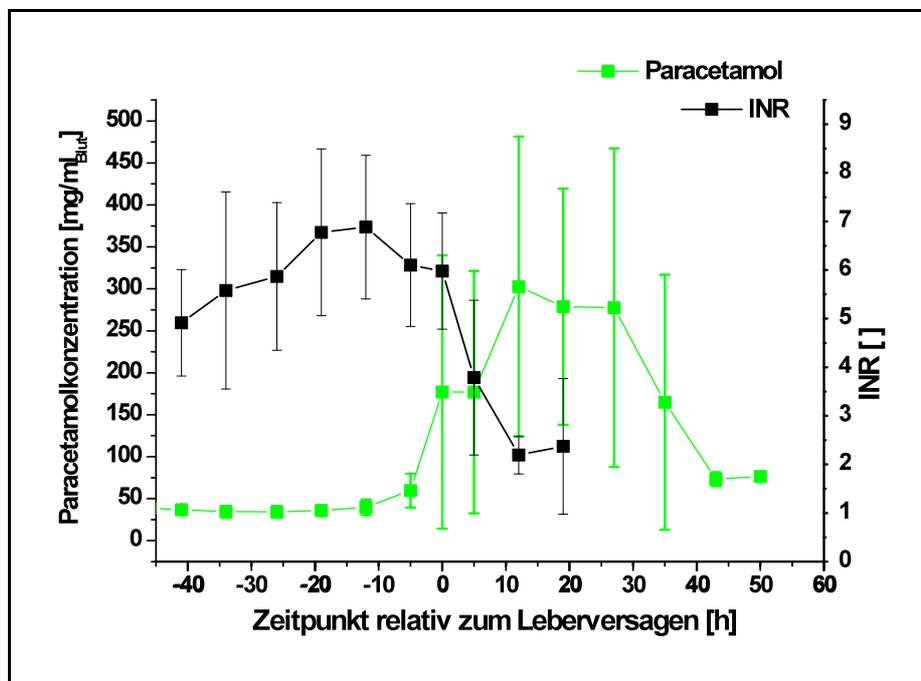


Abb.3.4: Paracetamolspiegel und INR-Wert relativ zum Leberversagen. INR und PPK wurden mind. alle 4 Stunden vom Zentrallabor des UKT bestimmt. Alle Werte wurden in 6-stündige Intervalle eingeteilt und als MW \pm S abgetragen. Die Anzahl der Messwerte n ist indiziert. 0 = Beginn des ALV.

Für die INR konnte ab 5 Stunden vor LV eine plötzliche starke Zunahme auf Werte bis über fünf festgestellt werden, welche das Vorhandensein eines ALV nochmals bestätigte (siehe Abb. 3.5).

Weiterhin ließ sich von der ersten Intoxikation an ein gleichmäßiger Anstieg der Kreatininkonzentration mit anschließender Persistenz der Werte auf einem hohen Niveau beobachten (siehe Abb.3.4).

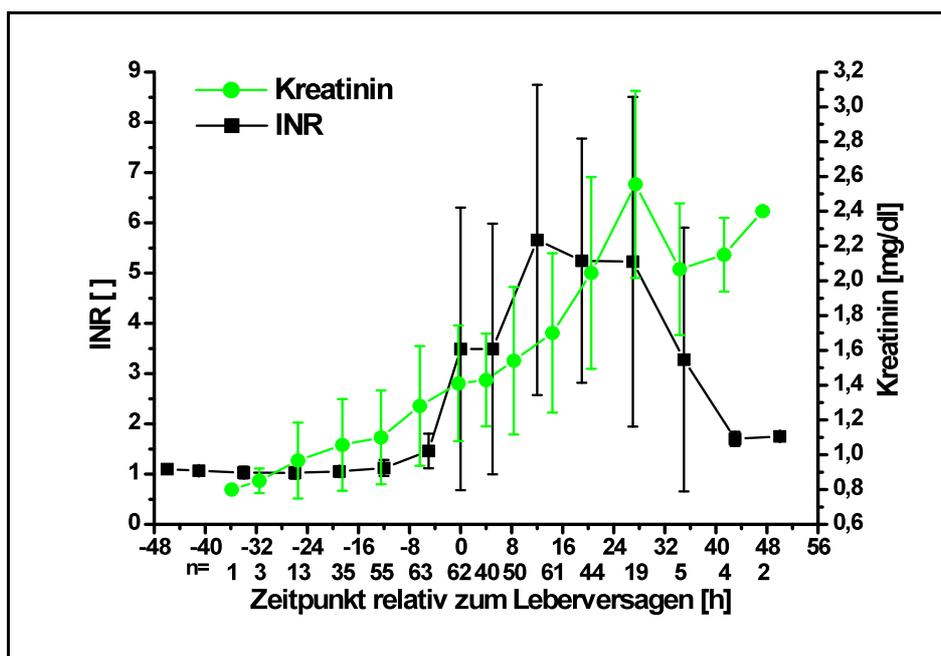


Abb.3.5: INR und Kreatininkonzentration relativ zum Leberversagen. Die INR und der Kreatininwert wurden alle 4 bis 8 Stunden vom Zentrallabor des UKT bestimmt. Alle Werte wurden in 6-stündige Intervalle eingeteilt und als MW \pm S abgetragen. Die Anzahl der Messwerte n ist indiziert. 0 = Beginn des ALV.

Zur weiterführenden individuellen Beurteilung des AZ und der Schwere der Leberfunktionsstörung dienten weitere Blut- und Gerinnungsparameter, wie der Hb, die Albuminkonzentration, die Thrombozytenzahl und die PTT. Diese sind in Tab.3.1 aufgeführt und zeigen sowohl einen Anstieg der PTT, eine fortschreitende Anämie und Thrombozytopenie, als auch eine starke Abnahme der Albuminkonzentration bis deutlich unter 1,0 g/dl.

Die Betrachtung dieser Parameter zeigt exemplarisch, dass mit zunehmendem Krankheitsfortschritt deutlich mehr Interventionen nötig waren, um den Zustand der Tiere möglichst stabil zu halten.

Die mittlere Überlebenszeit aller Studienschweine nach Intoxikation betrug $50,7 \pm 10,2$ Stunden und die mittlere Dauer des akuten Leberversagens $23,0 \pm 8,6$ Stunden.

Tab.3.1: Laborparameter. Errechnete Mittelwerte und Standardabweichungen relevanter Blutparameter aller Studientiere.

Zeit relativ Leberversagen [h]	Anzahl der Messwerte [n]	Thrombozyten [Tausend/ μ l]		Albumin [g/dl]		Hämoglobin [g/dl]		PTT [s]	
		MW	S	MW	S	MW	S	MW	S
-46	1	419,00		3,20		11,40		18,00	
-41	3	357,00	28,28	2,40	0,00	9,55	1,63	19,33	2,31
-34	13	471,67	114,59	2,60	0,46	9,32	0,91	26,92	19,82
-26	35	452,60	160,47	2,58	0,47	9,24	0,88	25,94	18,11
-19	55	443,46	104,51	2,37	0,48	9,15	0,76	20,37	11,27
-12	63	430,44	106,77	1,97	0,42	9,01	1,04	23,41	22,66
-5	62	410,79	111,36	1,26	0,58	9,81	1,45	40,22	39,37
0	40	288,10	113,19	0,37	0,14	9,68	1,67	85,24	47,47
5	50	130,43	97,82	0,53	0,34	8,42	1,38	101,91	58,51
12	61	54,25	57,80	0,33	0,29	7,02	2,00	136,85	44,70
19	44	28,25	24,85	0,41	0,32	5,29	2,14	123,55	50,21
27	19	27,45	26,68	0,51	0,55	5,38	1,19	107,68	57,96
35	5	42,67	22,94	0,67	0,23	6,73	2,90	121,60	60,04
43	4	45,00	35,36	0,85	0,35	5,65	0,49	65,25	63,20
50	2	55,00		0,50		5,90		49,50	3,54

3.1.3 Darstellung der Therapiegruppen

Im Folgenden werden die Ergebnisse vergleichend für die 4 Behandlungsgruppen zu jeweils 7 Tieren dargestellt. Bei Betrachtung des Überlebens nach Eintritt des LV ergab sich ein eindeutiges Bild (siehe Abb.3.6).

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Dauer des LV war für die MARS-Variante C-Therapie ein eindeutiger Vorteil gegenüber allen anderen Therapien festzustellen. Die MARS-Variante A-Therapie erwies sich mit einer mittleren Dauer des Leberversagens von $16,7 \pm 5,6$ Stunden als am wenigsten effektiv. Die Kontrollgruppe und die MARS-Variante B-Therapie zeigten eine vergleichbare Dauer des LV (siehe Tab.3.2).

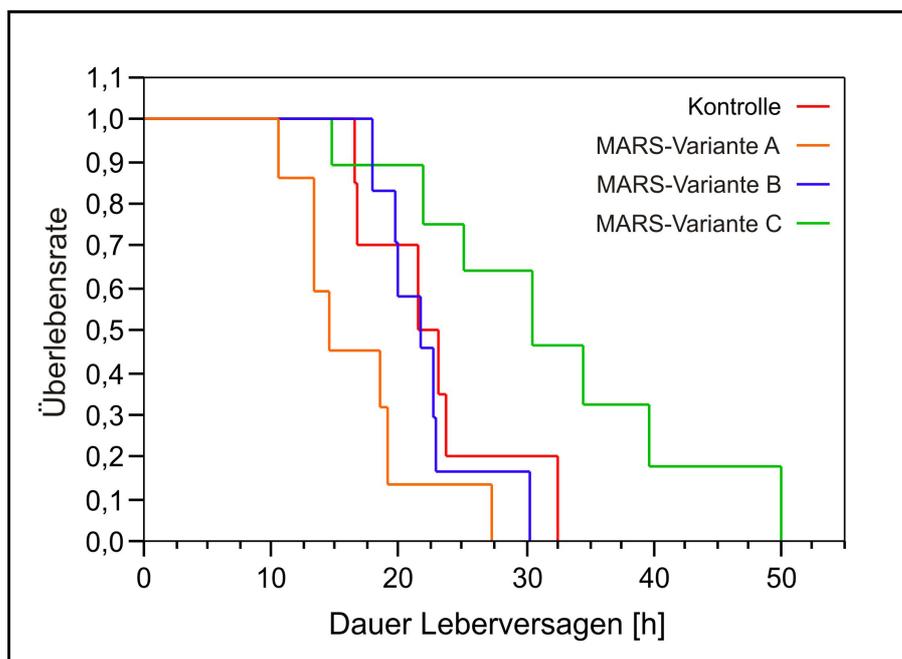


Abb.3.6: Überlebensdiagramm der Therapiegruppen. Abtragung der Dauer des LV aller Tiere (n=28) entsprechend ihrer Therapiegruppe nach der Methode von Kaplan-Meier.

Betrachtet man die Menge an Blutprodukten, die während der Therapie substituiert wurde, ergibt sich kein wesentlicher Unterschied für die 4 Behandlungsgruppen (siehe Tab.3.2). Nur die Menge an EK-Einheiten lag mit $4,4 \pm 2,3$ Einheiten in der MARS-Variante C-Gruppe deutlich höher als in den anderen Gruppen. Weiterhin bekamen die Tiere der Kontrollgruppe mit $2 \pm 2,5$ FFP-Einheiten deutlich weniger, als die anderen Studientiere.

Tab.3.2: Mittlere Dauer des Lebersversagens, mittleres Gesamtüberleben und mittlere Gabe von Blutprodukten entsprechend ihrer Behandlungsgruppen.

Therapiegruppe	Dauer des Lebersversagens [h]		Gesamtüberleben [h]		EK-Einheiten [300 ml]		FFP-Einheiten [300 ml]	
	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S
Kontrolle	22,2	5,4	47	4,3	1,1	1,2	2	2,5
MARS-Variante A	16,7	5,6	46	5,9	2,9	2,3	6	3,3
MARS-Variante B	22,2	4,0	48,9	8,0	1,6	1,3	5,4	2,5
MARS-Variante C	30,9	11,8	60,6	13,8	4,4	2,2	6,6	3,1

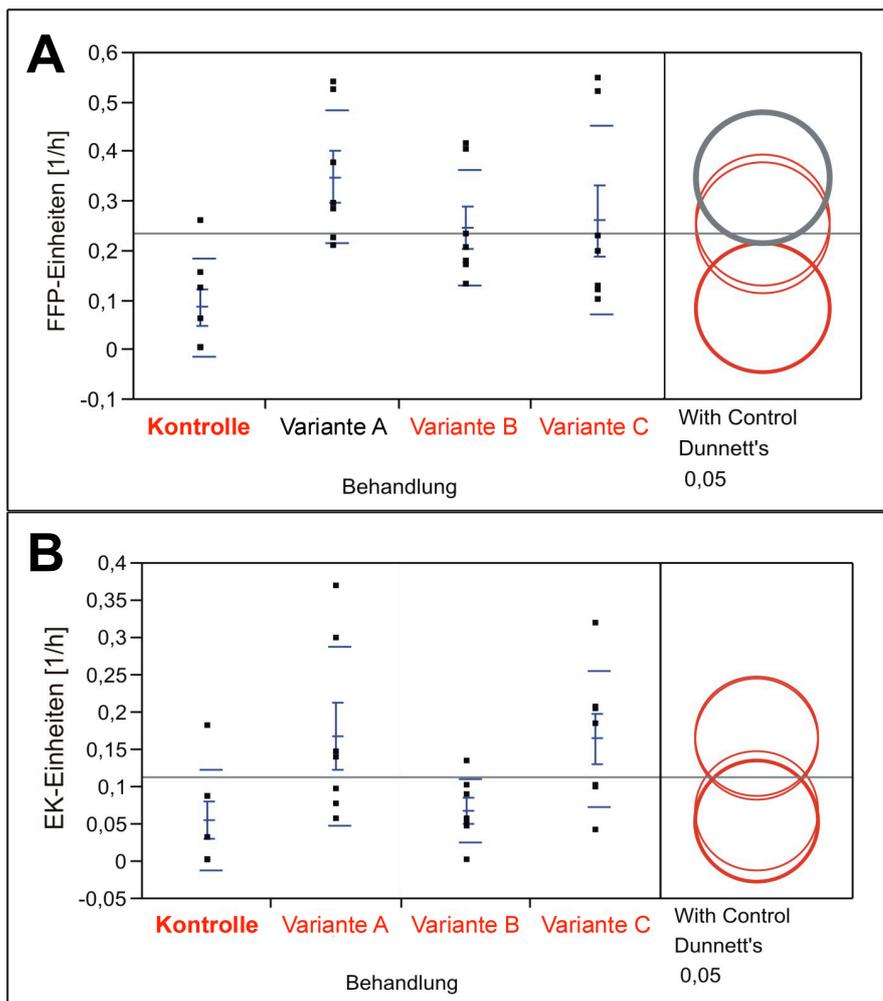


Abb.3.7: Infusionsmengen von Blutprodukten relativ zur Dauer des Leberversagens. Die infundierten Einheiten von Blutprodukten pro Stunde LV wurden ermittelt und anhand des Dunnett's Tests auf signifikante Unterschiede der Therapien gegen die Kontrollgruppe hin untersucht. Die Anzahl der Messwerte ist für jede Gruppe n=7.

A: EK-Einheiten
B: FFP-Einheiten

Normierte man jedoch jeweils die Infusionsmengen an Blutprodukten auf die Dauer des LV ergab sich ein differenziertes Bild (siehe Abb.3.7), wobei den MARS-Variante A-Tieren signifikant mehr FFP-Einheiten infundiert wurden. Außerdem zeigte sich für die MARS-Variante A- und die MARS-Variante C-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte EK-Substitution pro Stunde LV.

Trotz erhöhter EK-Substitution war für diese Gruppen sowohl relativ zum LV, als auch relativ zum Exitus eine verstärkte Abnahme der Hämoglobinkonzentration, vor allem gegenüber der MARS-Variante B-Gruppe festzustellen (siehe Abb.3.8).

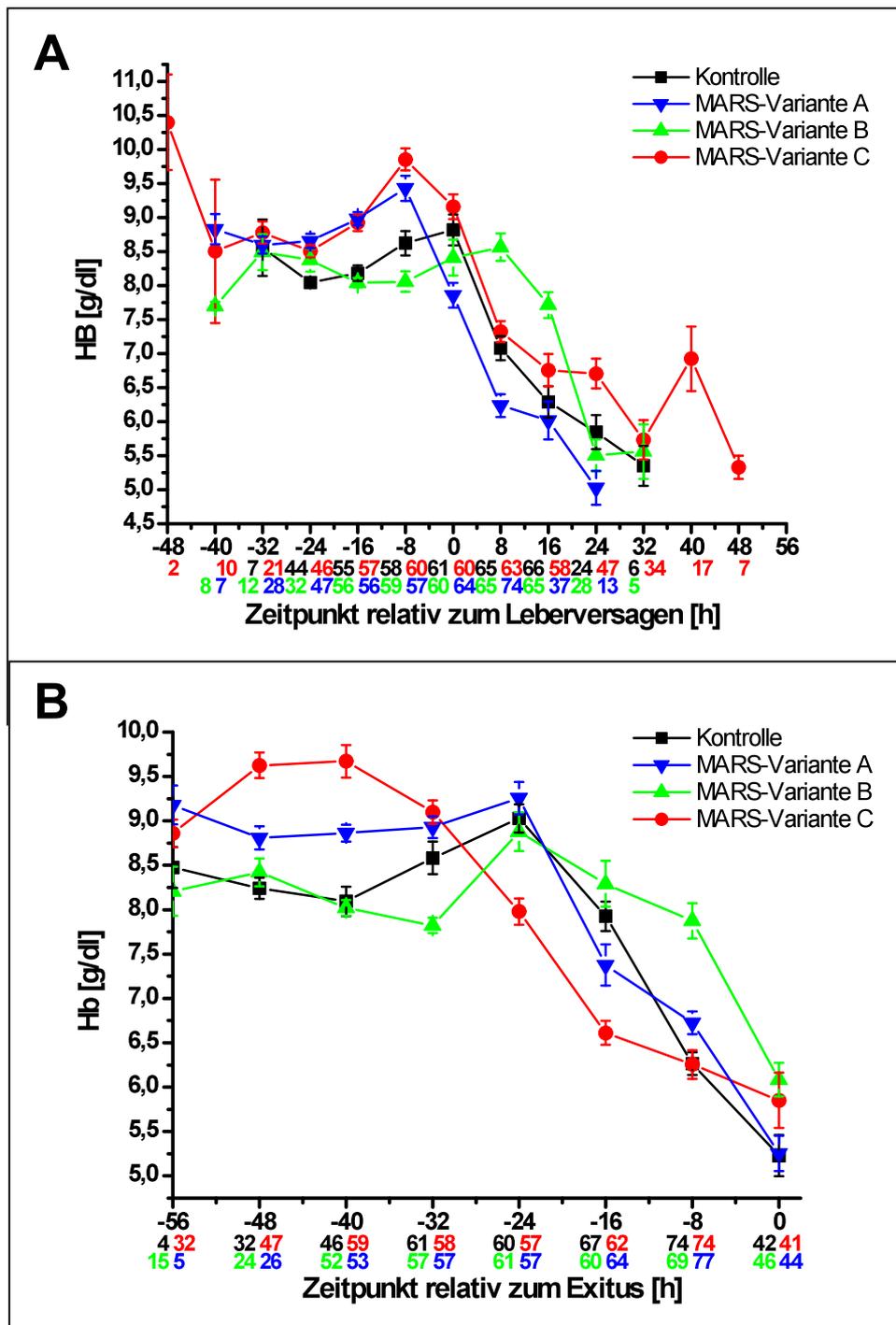


Abb.3.8: Hämoglobinkonzentration relativ zur Zeit. Der Hb der Tiere wurde über 8 Stunden gemittelt und nach Therapien getrennt als MW \pm SF gegen die Zeit abgebildet. Die Anzahl der Messwerte ist indiziert. **A:** Zeit relativ zum LV, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus

Weitere notwendige Interventionen in der intensivmedizinischen Therapie der 4 Behandlungsgruppen sollen im Folgenden erörtert werden.

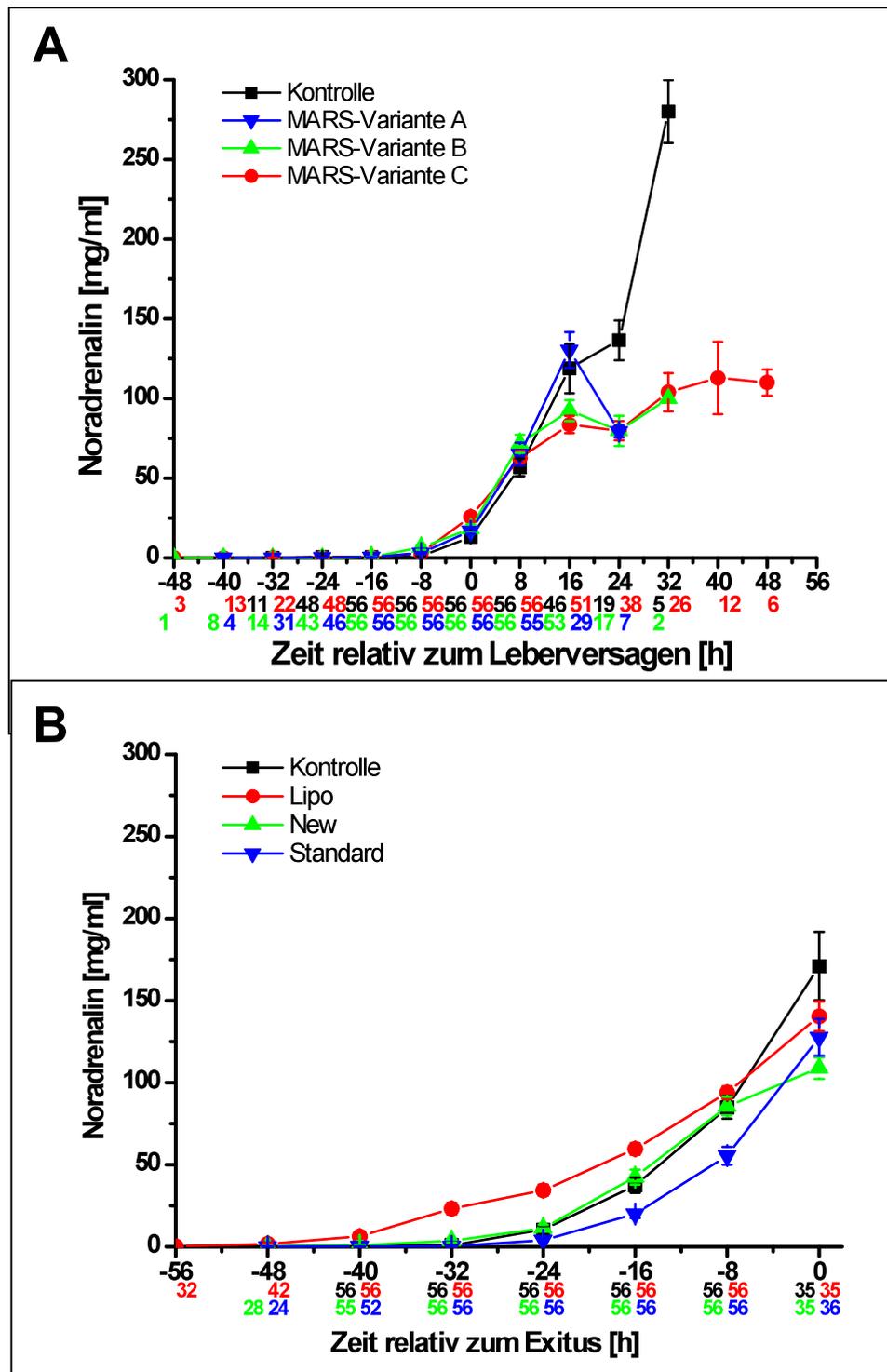


Abb.3.9: Noradrenalinmenge relativ zur Zeit. Die benötigte Noradrenalinmenge wurde getrennt nach Behandlungsgruppen über acht Stunden gemittelt und als $MW \pm SF$ gegen die Zeit aufgetragen. Die Anzahl der Messwerte ist indiziert **A**: Zeit relativ zum LV, 0 = Beginn des ALV **B**: Zeit relativ zum Exitus

Generell ist festzustellen, dass alle Tiere ab 8 Stunden vor LV einen stark ansteigenden Bedarf an Katecholaminen hatten, der bis 8 Stunden nach LV weiter zunahm. Danach ergab sich für die verschiedenen Behandlungsformen ein unterschiedliches Bild (siehe Abb.3.9). Auffallend war, dass die Tiere der Kontrollgruppe eindeutig mehr Arterenol als alle anderen Tiere benötigten, wohingegen sich die Tiere, die eine MARS-Therapie erhielten, kaum voneinander unterschieden.

Ein Vergleich der durchschnittlich infundierten Voluven-Menge pro Stunde LV ergab für die Kontrollgruppe und für die MARS-Variante A-Gruppe einen eindeutig, jedoch nicht signifikant höheren Bedarf an Plasmaexpandern verglichen mit den beiden anderen Gruppen (siehe Abb.3.10).

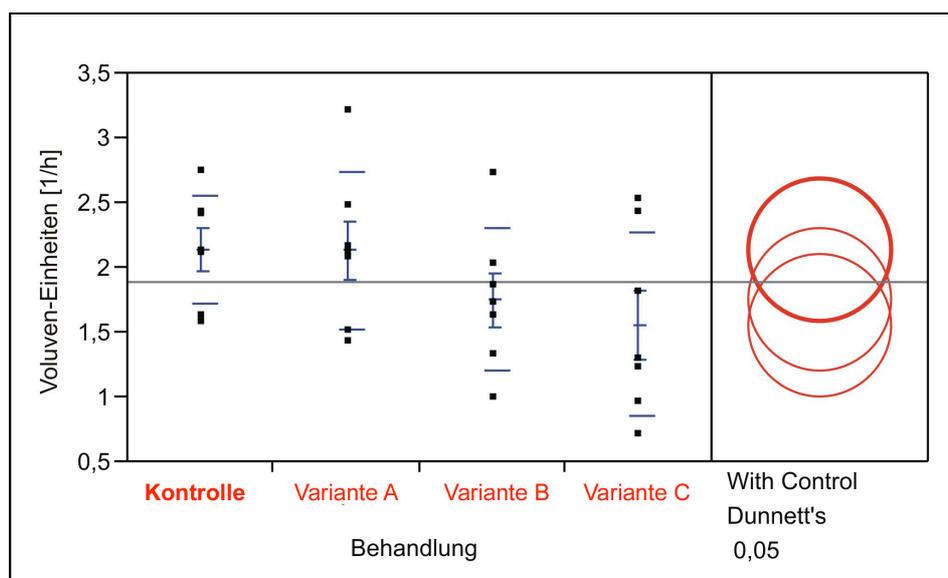


Abb.3.10: Durchschnittlich gegebene Voluvenmenge pro Stunde Leberversagen. Die gegebene Menge an Voluven wurde als Durchschnitt pro Stunde LV getrennt nach Therapien dargestellt. Anhand des Dunnett's Tests wurde auf Signifikanz getestet.

Die Abtragung der rektalen Temperatur für die 4 Behandlungsformen relativ zum LV zeigt, dass die Körpertemperatur der Tiere der 3 MARS-Therapie-Gruppen bei Erreichen des LV und in den darauffolgenden 8 Stunden stärker abfiel als bei den Kontrolltieren (siehe Abb.3.11).

Bei Betrachtung der stündlichen Ausscheidung der Tiere stellte man anfänglich einen leichten Anstieg der Diurese über die Zeit der Intoxikation fest. Ab dem Zeitpunkt des LV zeigte sich ein starker Abfall dieser in den folgenden 16 Stunden (siehe Abb.3.12). Diese Tendenz weist auf die Entwicklung eines Hepatorenalen-Syndroms (HRS) bei allen Studientieren hin, von denen einzig die MARS-Variante C-Tiere zum Exitus hin eine wieder ansteigende Diurese zeigten.

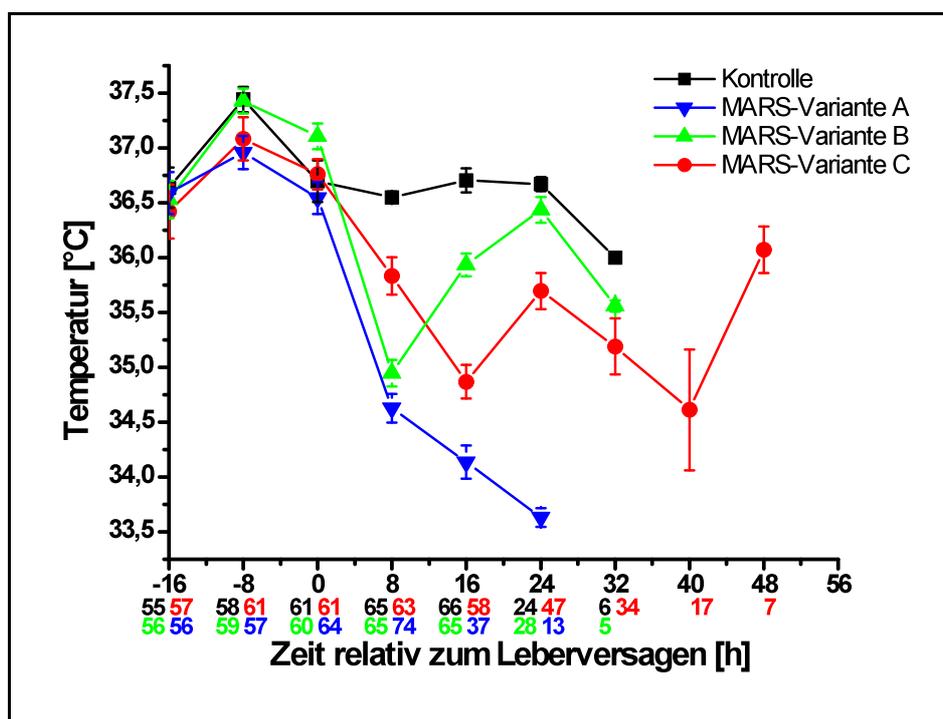


Abb.3.11: Entwicklung der Körperkerntemperatur relativ zum Leberversagen. Es wurde die rektale Temperatur der Tiere als MW \pm SF über acht Stunden gegen die Zeit relativ zum LV aufgetragen. Die Anzahl der Messwerte ist indiziert. 0 = Beginn des ALV.

Das Kreatinin als Nierenparameter stieg, wie bereits besprochen, bei allen Tieren stark an (siehe Abb.3.5). Eine Auftrennung der Werte nach Behandlungsgruppen ergab jedoch für die Kreatininwerte der MARS-Variante C- und der Kontrolltiere über den Zeitraum des LV einen weitaus deutlicheren Anstieg (siehe Abb.3.13 **A**), als die der anderen Therapiegruppen. Beim Vergleich der Gruppen erwiesen sich die Kreatininkonzentrationen der MARS-Variante B- und der MARS-Variante A-Gruppe zum Zeitpunkt des Exitus als signifikant niedriger (siehe Abb.3.13 **B**).

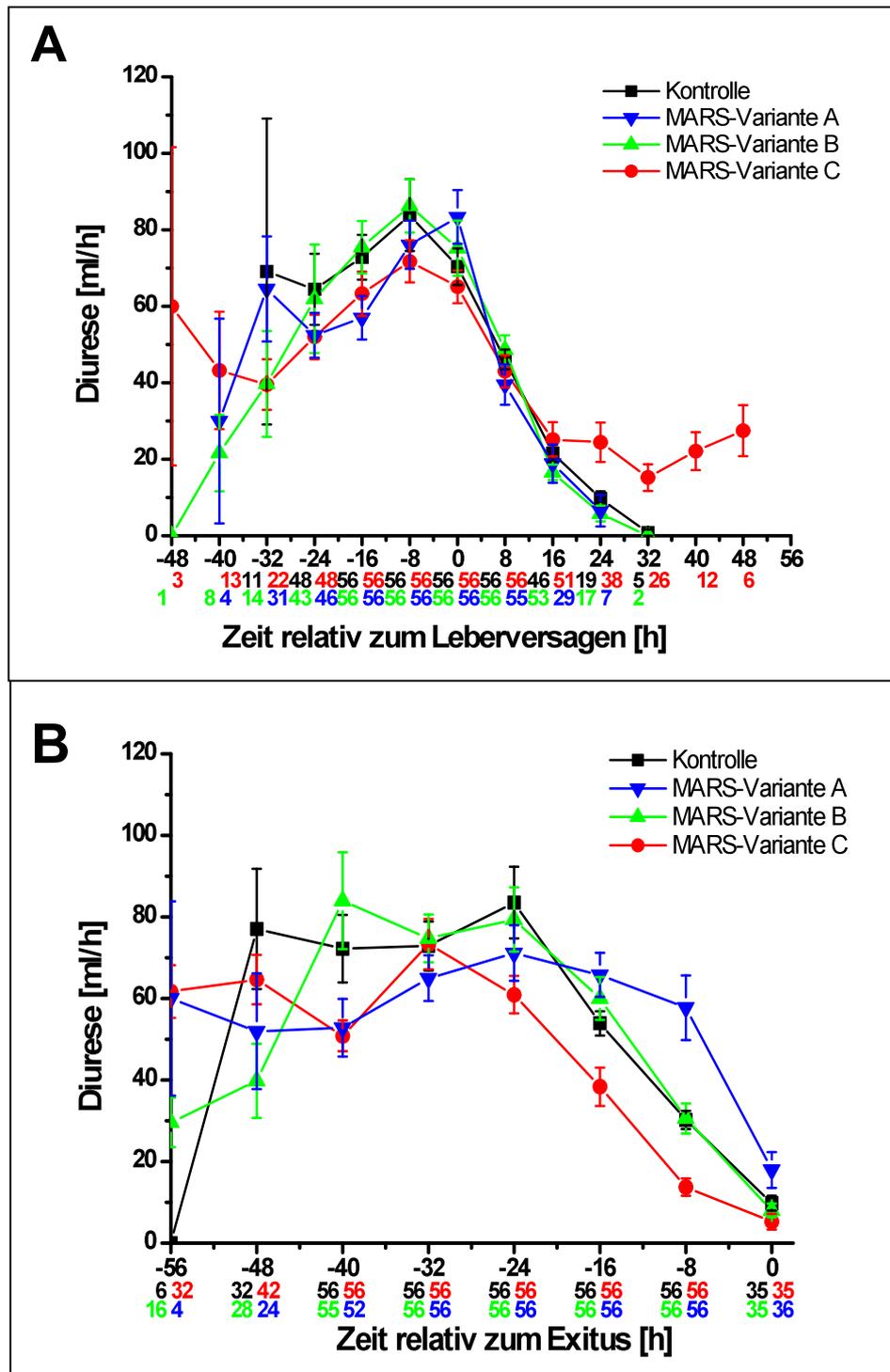
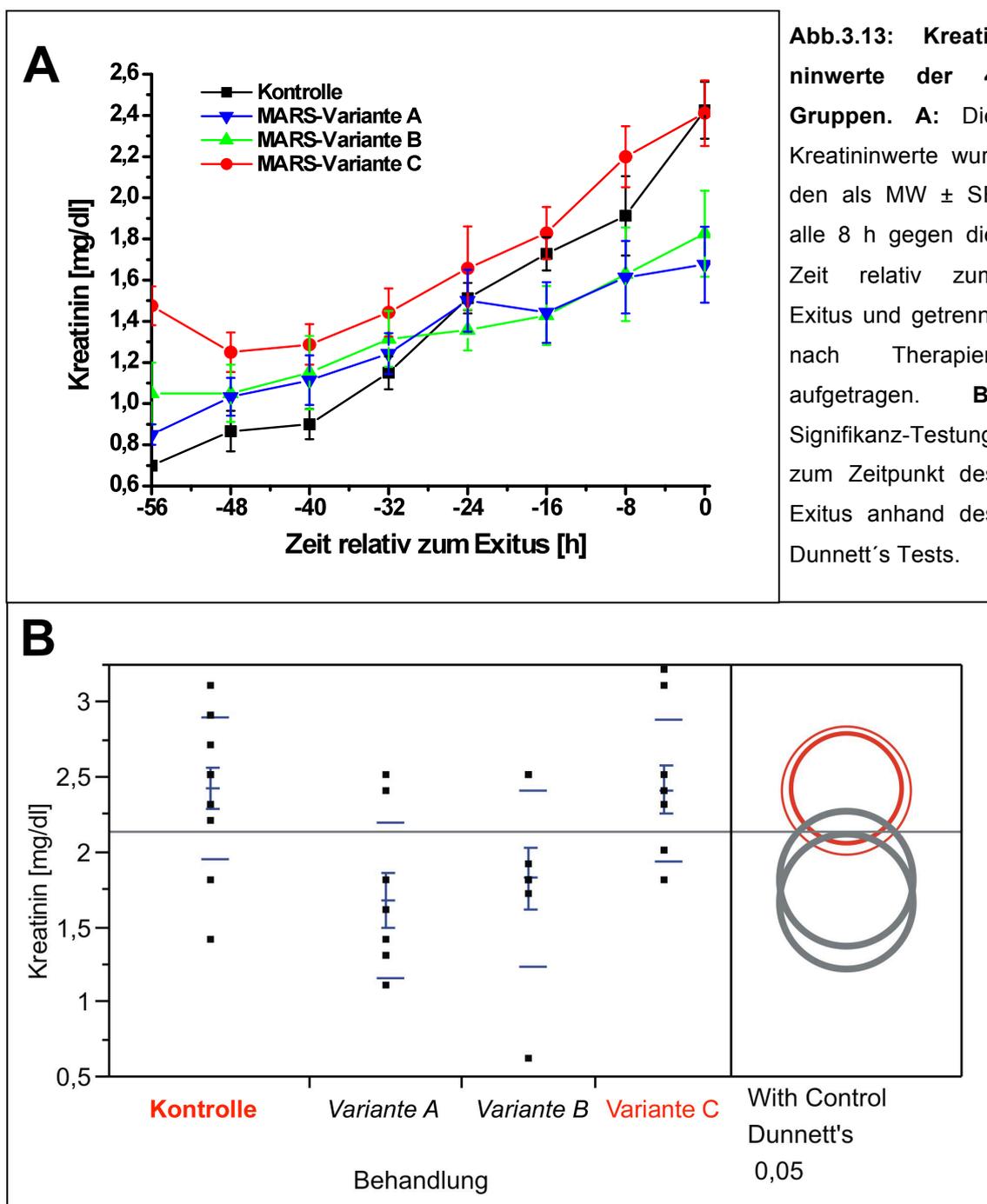
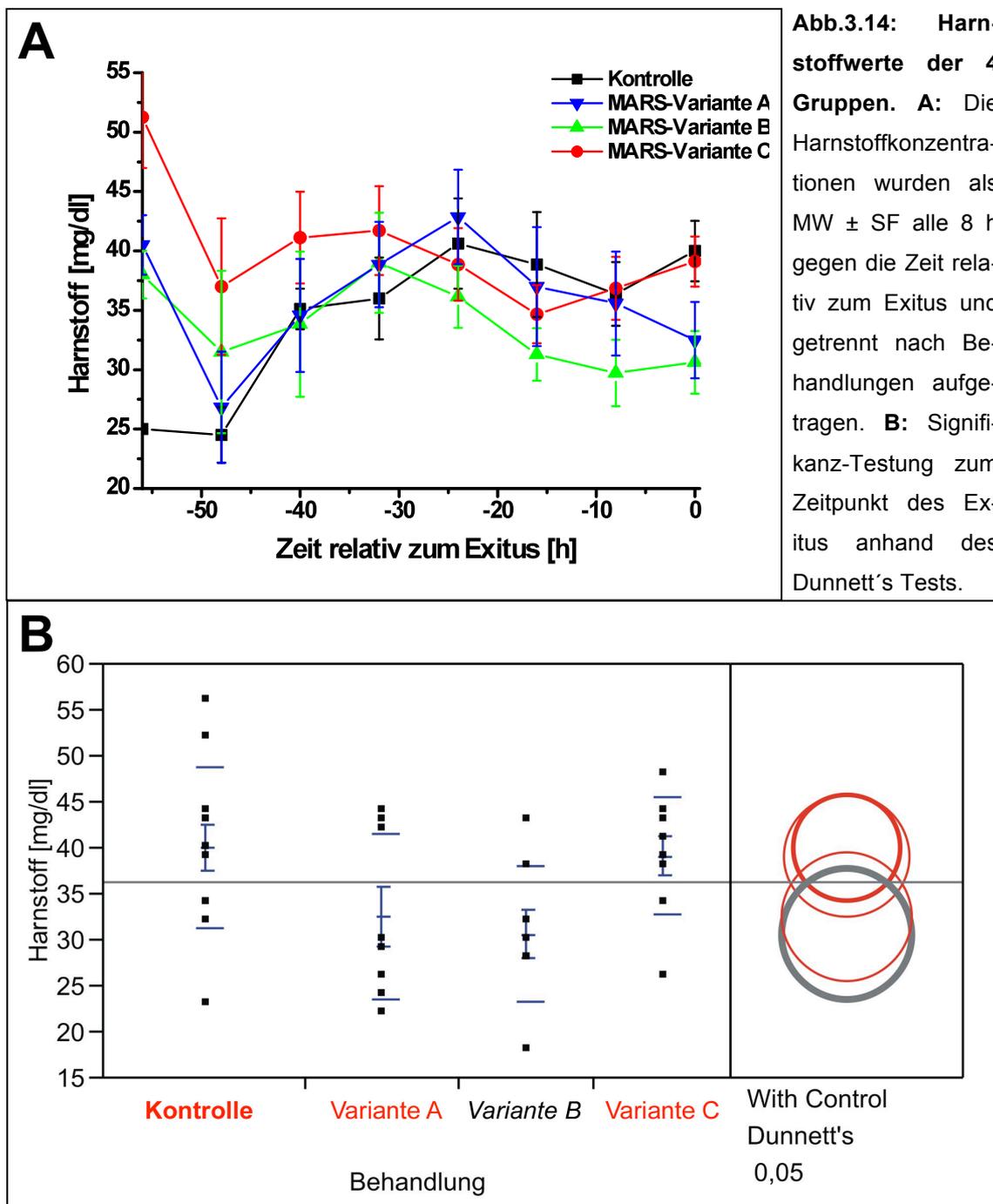


Abb.3.12: Diuresis der 4 Gruppen aufgetragen gegen die Zeit. Die stündlichen Ausscheidungsmengen der Tiere der verschiedenen Behandlungen wurden über acht Stunden gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Anzahl der Messwerte und der Standardfehler sind in der Abbildung indiziert. **A:** Zeit relativ zum LV, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus



Für die Harnstoffkonzentration wurden ähnliche Entwicklungen beobachtet. Auch hier stiegen die Konzentrationen der MARS-Variante C- und der Kontrolltiere über den Zeitraum des LV schneller an, als bei den anderen Tieren (siehe Abb.3.14 A). Zum Zeitpunkt des Exitus waren die Konzentrationen der MARS-Variante A-Tiere deutlich, die der MARS-Variante B-Gruppe signifikant niedriger als die der beiden anderen Behandlungsgruppen (siehe Abb.3.14 B).



Im Folgenden wurden diverse weitere Blutparameter vergleichend für die 4 Therapiegruppen jeweils relativ zum Zeitpunkt des Leberversagens und relativ zum Exitus betrachtet.

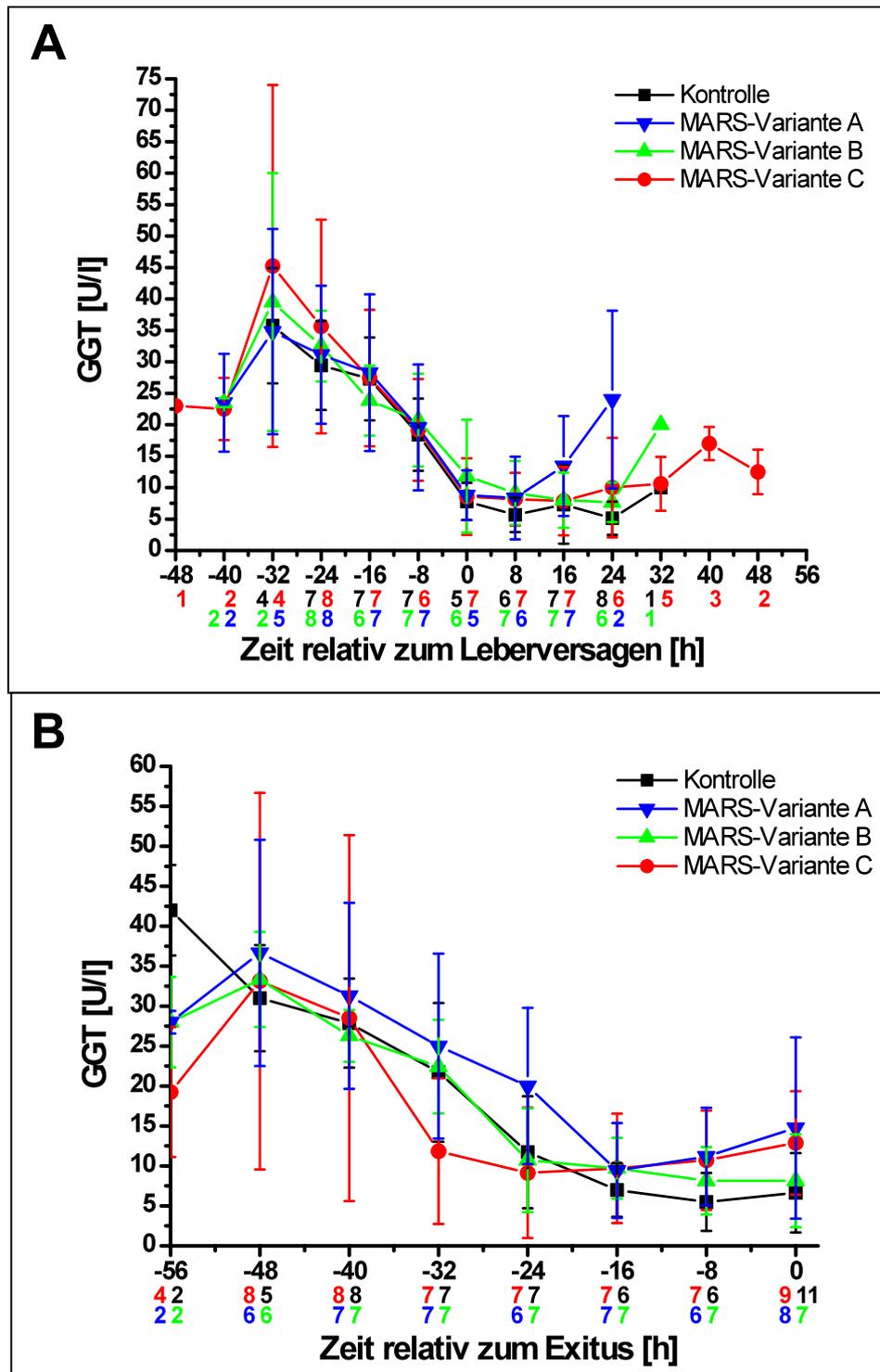


Abb.3.15: GGT der verschiedenen Gruppen relativ zur Zeit. Das Leberenzym GGT wurde für die Tiere der jeweiligen Gruppen über acht Stunden gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Der indizierte Fehler entspricht der Standardabweichung, die Anzahl der Messwerte ist angezeigt. **A:** Zeit relativ zum Leberversagen, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus

Für die Leberwerte GGT, GOT und GPT wurden die Messwerte über die Laborintervalle von 8 Stunden gemittelt und vergleichend für die verschiedenen Therapiegruppen gegen die Zeit relativ zum LV und zum Exitus abgebildet.

Generell fanden sich vergleichbare GGT-Werte vor Intoxikation und leicht ansteigende Werte nach Intoxikation. Zum Zeitpunkt des Leberversagens war dann ein deutlicher Abfall dieser zu beobachten (siehe Abb.3.15). Im weiteren Versuchsverlauf zeigten die Messwerte der MARS-Variante B-Therapie kaum Veränderungen, wohingegen die GGT-Konzentrationen der Kontrolltiere tendenziell abfallend waren. Rund 16 Stunden vor Exitus war für die MARS-Variante C- und die MARS-Variante A-Therapie ein Anstieg der Werte zu verzeichnen, der im Vergleich zu den anderen Gruppen bei den MARS-Variante A-Tieren deutlicher war. Die Entwicklung der GGT-Konzentrationen befand sich jedoch ab Intoxikation stets im Referenzbereich.

Bei Betrachtung der GOT war nach ähnlichen Ausgangswerten ab acht Stunden nach LV in allen Gruppen ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, wobei hier die Tiere der MARS-Variante C-Therapie die höchsten Werte erreichten, während die Messwerte der MARS-Variante B-Gruppe unter allen anderen blieben (siehe Abb.3.16).

Für die GPT-Werte konnte über den gesamten Zeitraum der Intoxikation bis hin zum LV ein kontinuierlicher Abfall festgestellt werden. Zum Zeitpunkt des Leberversagens und im Folgenden war in allen Gruppen ein Anstieg der Konzentrationen zu verzeichnen, der in der Kontrollgruppe am deutlichsten ausgeprägt war. Bei den Tieren der MARS-Variante C zeigte sich eine zur Kontrollgruppe vergleichbare Entwicklung der Messwerte, die sich jedoch weniger fulminant darstellte, aber zum Exitus hin die höchsten Konzentrationen aufwies. Die MARS-Variante B- und MARS-Variante A-Tiere blieben mit vergleichbaren Werten unter denen der beiden anderen Gruppen (siehe Abb.3.17).

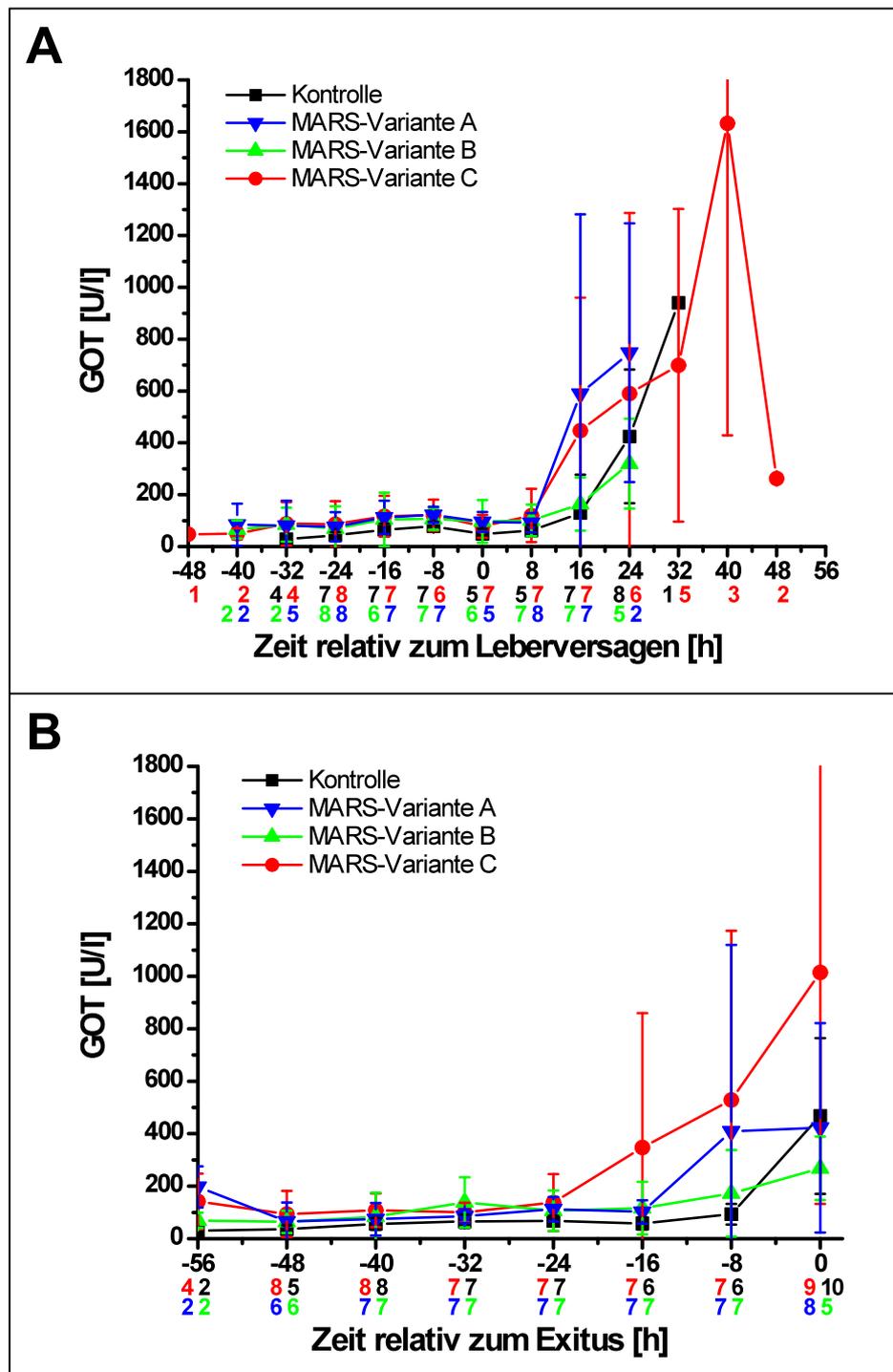


Abb.3.16: GOT aufgetragen gegen Zeit. Der Leberwert GOT ist für alle Tiere als Mittelwert über acht Stunden und aufgetrennt für die 4 Behandlungen dargestellt. Die Abbildung zeigt die Werte als MW \pm S, die Anzahl der Messwerte ist indiziert. **A:** Zeit relativ zum Leberversagen, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus

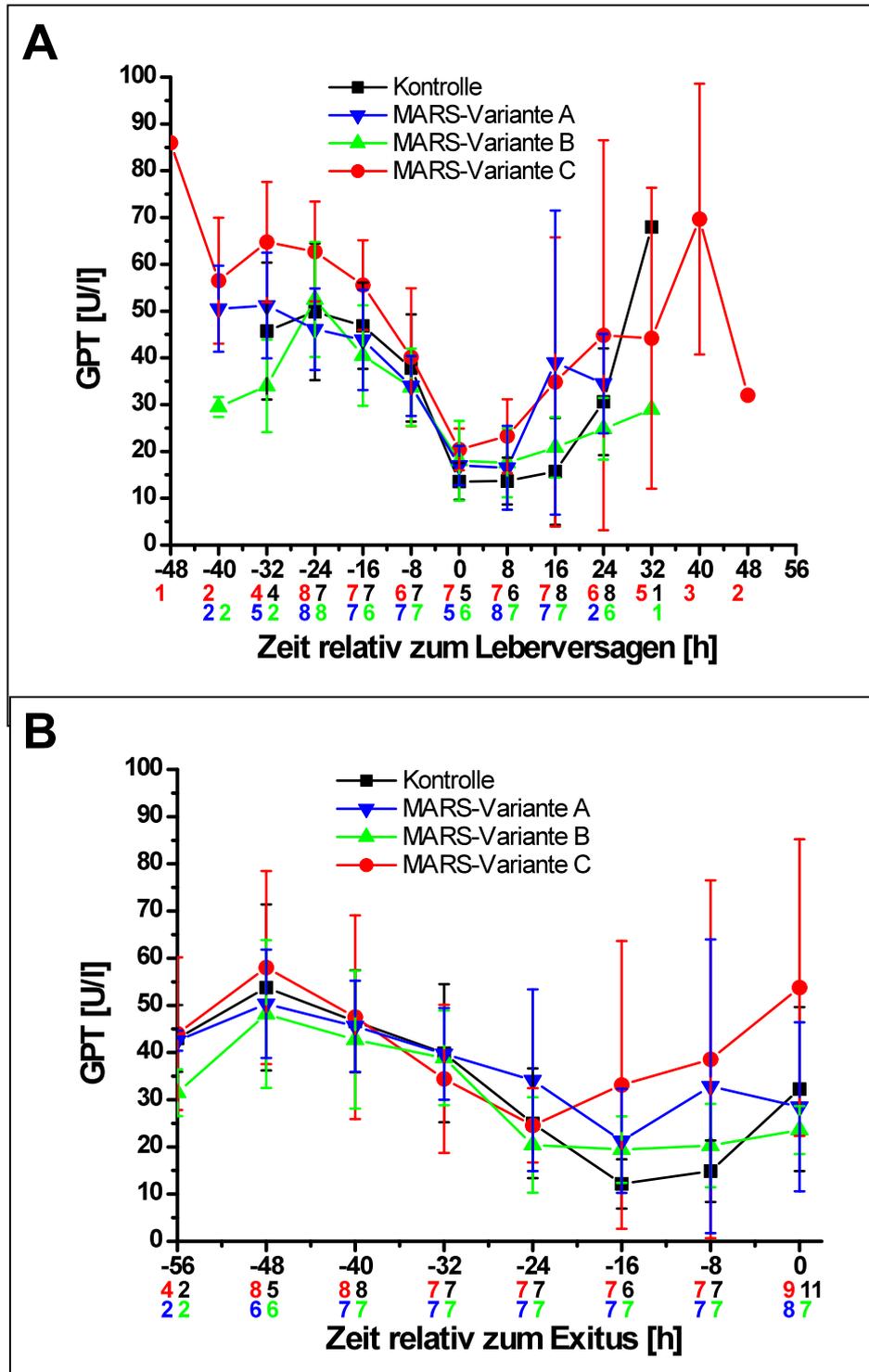


Abb.3.17: GPT aufgetragen gegen die Zeit. Der Leberwert GPT wurde über 8 Stunden gemittelt und je nach Therapie als MW \pm S gegen die Zeit abgebildet. Die Anzahl an Messwerten ist indiziert. **A:** Zeit relativ zum LV, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus

Zusätzlich zu den Leberwerten wurden weitere Blutparameter der 4 Gruppen auf ihre Entwicklung hin untersucht. Auch hier wurden MW \pm S über die Laborintervalle (8 h) gegen die Zeit relativ zum LV und zum Exitus abgetragen.

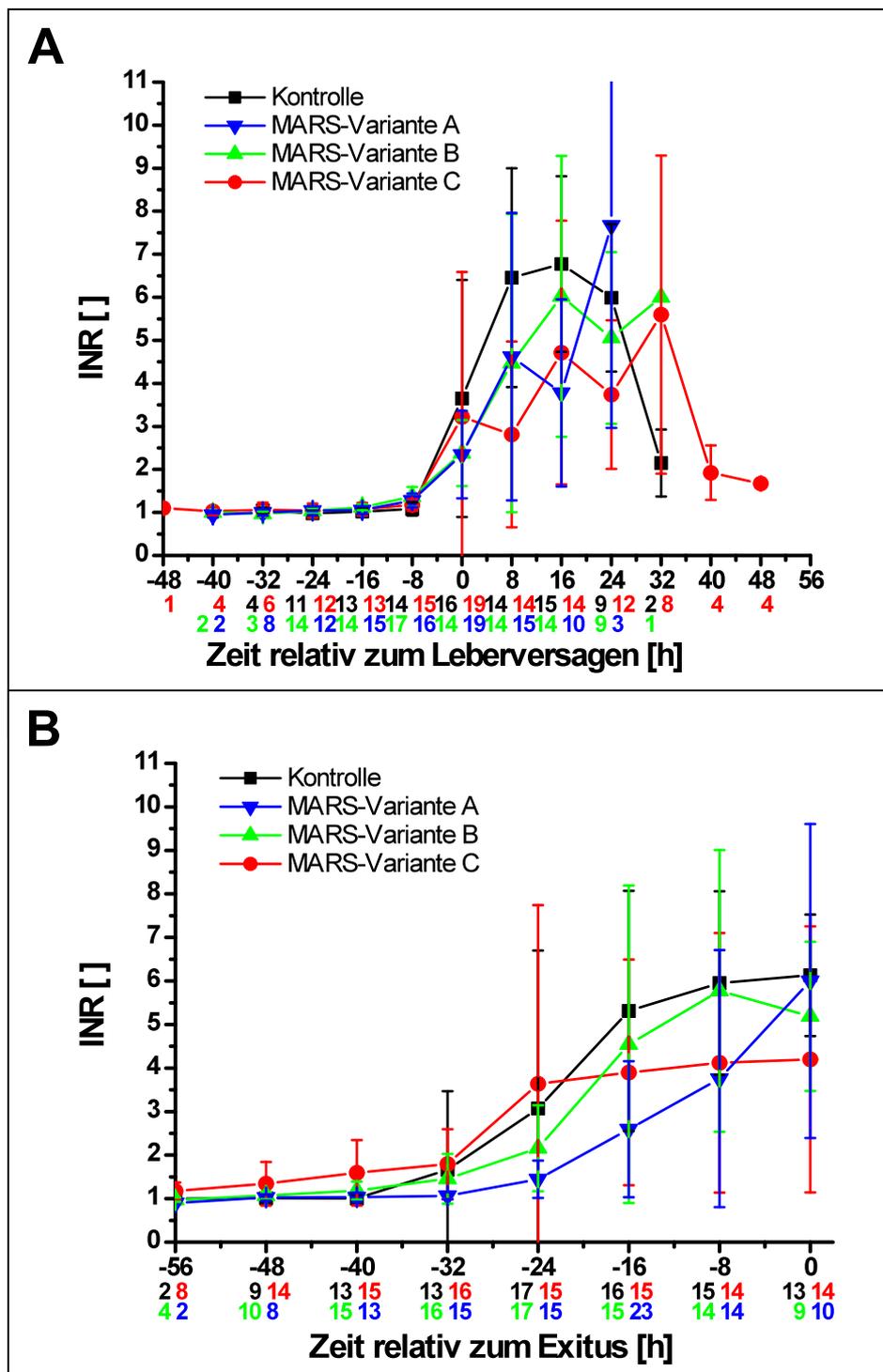


Abb.3.18: INR aufgetragen gegen die Zeit. Die INR wurde über 8 Stunden als MW \pm S getrennt nach Therapieverfahren gegen die Zeit abgebildet, die Anzahl von Messwerten ist indiziert. **A:** Zeit relativ zum LV, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus.

Wie bereits gezeigt war für die INR ein starker Anstieg festzustellen (siehe Abb.3.5). Betrachtete man nun die 4 Therapiegruppen einzeln, ergab sich ein differenziertes Bild (siehe Abb.3.18). So stiegen die Messwerte der MARS-Variante C-Gruppe weniger stark an und blieben zum Exitus unter den Werten der übrigen Therapiegruppen. Die Tiere der anderen MARS-Behandlungen, zeigten einander vergleichbare Werte, während die Kontrollgruppe insgesamt die höchsten Werte aufwies und auch zum Exitus hin eine weiter steigende Tendenz zu verzeichnen war.

Die Laktatkonzentration als Zeichen für anaerobe Zellatmung wurde durch BGAs ermittelt. Für alle Tiere waren ansteigende Laktat-Werte zu beobachten, wobei die MARS-Variante C-Tiere relativ zum Exitus die höchsten Werte erreichten, relativ zum LV jedoch eine rückläufige Tendenz zeigten (siehe Abb.3.19). Die Werte der Kontroll-, der MARS-Variante B- und der MARS-Variante A-Gruppe waren zu jeder Zeit stark ansteigend, lagen aber etwa auf demselben Niveau.

Ein Marker für Zelluntergang im Organismus ist die LDH, die hinsichtlich der verschiedenen Therapien im Folgenden näher betrachtet wird (siehe Abb.3.20). Die LDH-Konzentrationen aller Gruppen waren bis zum Eintritt des LV vergleichbar. Zum Zeitpunkt des LV war für die MARS-Variante C- und die MARS-Variante A-Gruppe eine spontane und starke Zunahme zu beobachten. 16 Stunden nach LV war bei diesen Gruppen eine leicht sinkende Tendenz wahrzunehmen, wohingegen die LDH-Konzentration der Kontrolltiere ab diesem Zeitpunkt einen fulminanten Anstieg aufwies, der sich in weit höheren LDH-Konzentrationen äußerte. Für die MARS-Variante B-Tiere wurden deutlich niedrigere Werte gemessen, die zu keiner Zeit so stark anstiegen, wie in den anderen Gruppen und die zum Exitus hin die niedrigsten Werte zeigten.

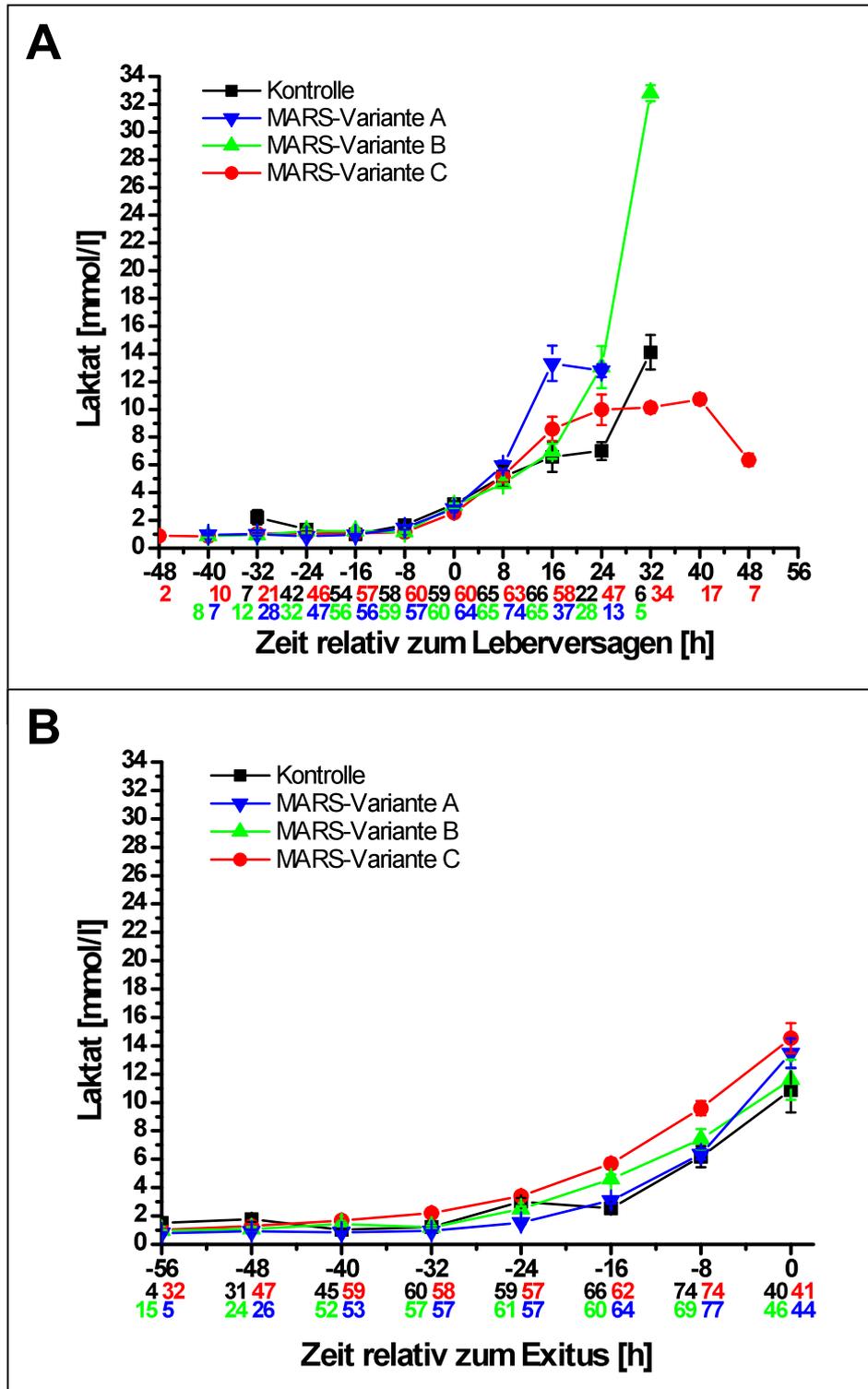


Abb.3.19: Laktatwerte relativ zur Zeit. Über Intervalle von 8 Stunden wurden die Laktatwerte als $MW \pm SF$ getrennt nach Behandlung gegen die Zeit abgebildet. Die Anzahl der Messwerte ist indiziert. **A:** Zeit relativ zum LV, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus

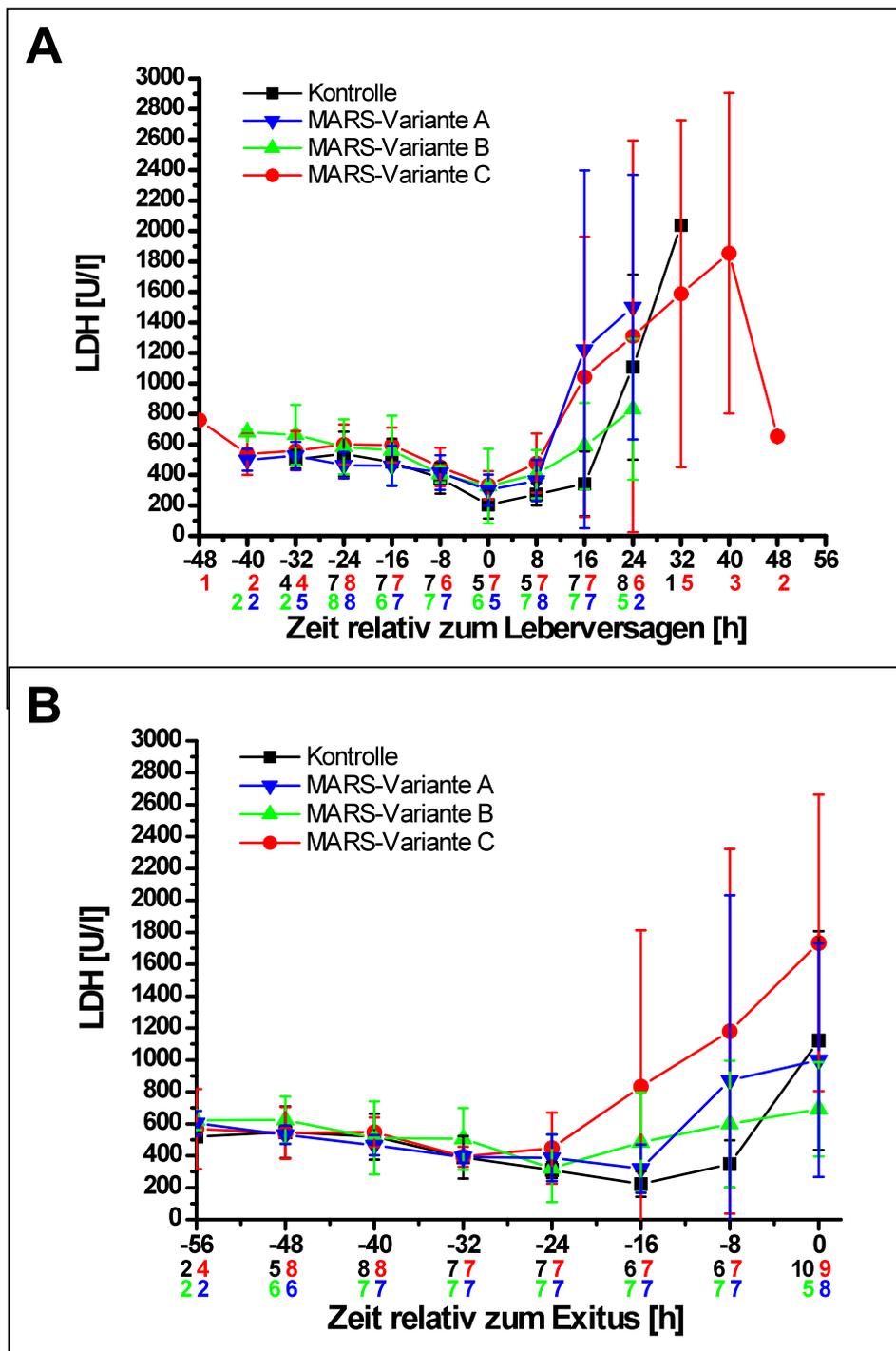


Abb.3.20: Die LDH aufgetragen gegen die Zeit. Die LDH-Konzentration wurde aufgetrennt nach Therapiegruppe als $MW \pm S$ über 8 Stunden relativ zur Zeit dargestellt. Die Anzahl der Messwert ist indiziert. **A:** Zeit relativ zum LV, 0 = Beginn des ALV **B:** Zeit relativ zum Exitus

3.2 GSH/GSSG-Konzentration im Lebergewebe

Um die Vorgänge während eines PCM-induzierten ALV auf zellulärer Ebene betrachten und bewerten zu können, wurden zunächst die Leberbiopsien, die vor Intoxikation, anschließend alle 24 Stunden, sowie bei Exitus entnommen und in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wie unter 2.2 beschrieben aufgearbeitet und vermessen.

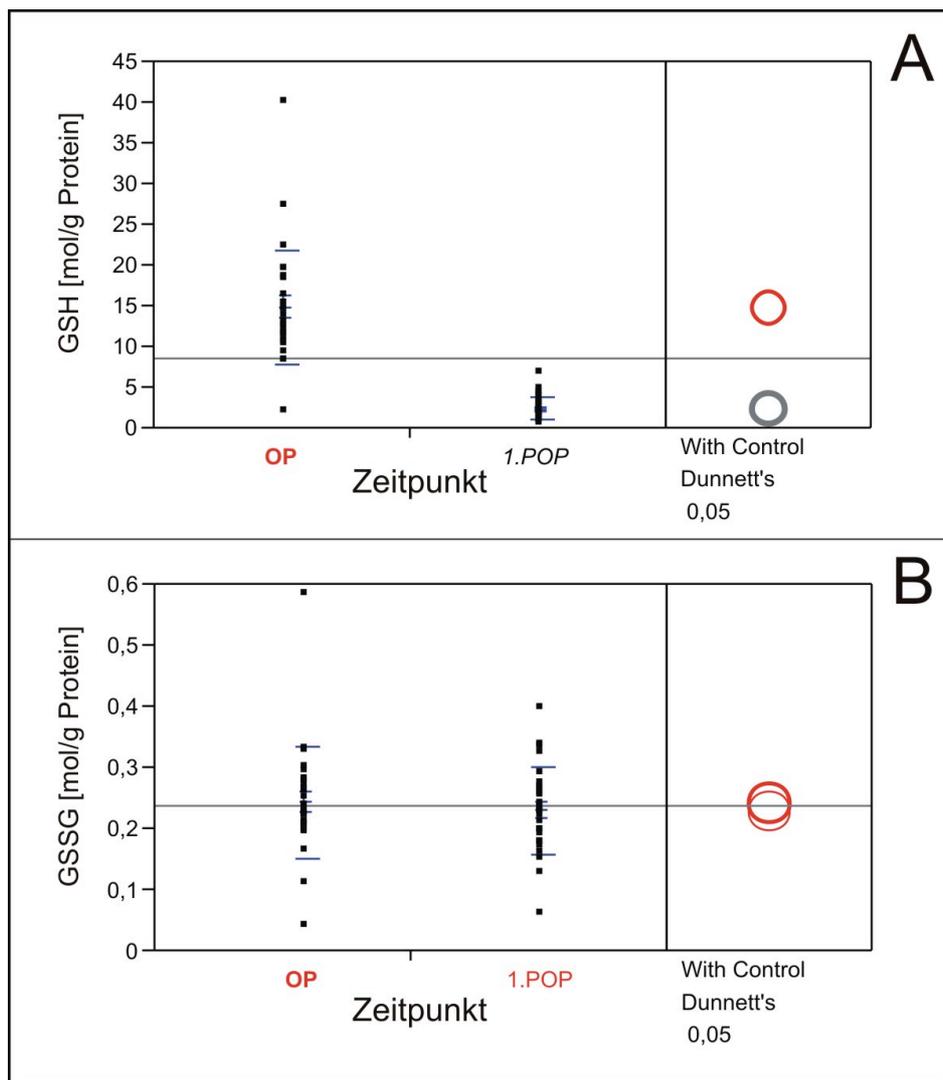


Abb.3.21: Vergleich der Glutathionkonzentrationen. Zum Vergleich der GSH-Konzentrationen vor Intoxikation (OP) und 24 Stunden nach Intoxikation (1.POP) wurden die Biopsieproben aller 28 Tiere aufgearbeitet und vermessen. Anhand des Dunnett's Tests wurde auf signifikante Änderungen hin untersucht und gegen den Zeitpunkt relativ zur Intoxikation (n=28) aufgetragen. **A:** Konzentration von GSH **B:** Konzentration von GSSG

Diese Gewebeproben wurden auf ihren GLU- und NADH/NAD-Gehalt hin untersucht. Hierbei zeigte sich für die Proben des ersten postoperativen Tages (1.POP) vergleichend zu den Proben vor Intoxikation eine signifikante Depletion der totalen GLU-Konzentration (siehe Abb.3.21 **A**), wohingegen die Betrachtung des zellulären Gehalts an GSSG keine Veränderung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Intoxikation zeigte (siehe Abb.3.21 **B**).

Um mögliche Unterschiede in der Entwicklung der GLU-Konzentration hinsichtlich der Therapiegruppen zu erfassen, wurden die Messwerte im Folgenden getrennt untersucht.

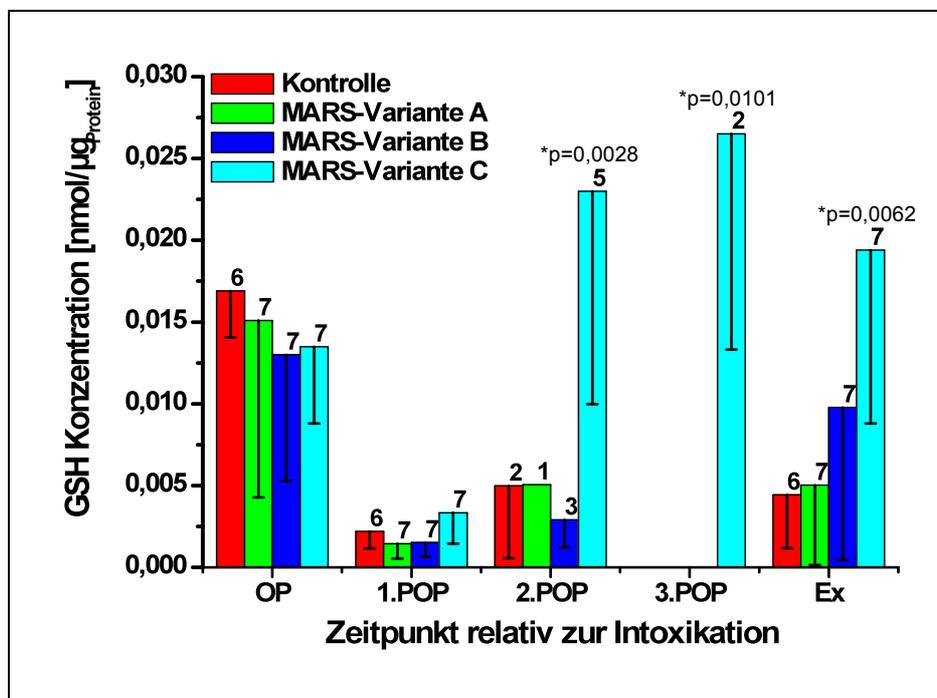


Abb.3.22: Totale Glutathionkonzentrationen der einzelnen Therapiegruppen. Die ermittelten Werte wurden gesondert nach Therapiegruppen gegen den Zeitpunkt der Intoxikation aufgetragen und anhand des Dunnett's Tests auf Signifikanz gegen den 1.POP getestet. Die Werte sind als MW \pm S abgetragen, die Anzahl der Messwerte über den Balken indiziert.

Der Vergleich der totalen GLU-Konzentration im ALV zeigte für die Kontrolltiergruppe, die MARS-Variante A- und die MARS-Variante B-Gruppe keine relevanten Unterschiede. Die MARS-Variante C-Gruppe zeigte hingegen ab dem 2.

POP bis hin zum Exitus eine signifikante Steigerung des totalen GLU-Gehalts gegenüber dem 1. POP (siehe Abb.3.22).

Die Messungen von GSSG ergaben vergleichend für alle Therapiegruppen nur für die Messwerte im Exitusbereich der MARS-Variante C-Therapie einen signifikanten Unterschied (siehe Abb.3.23). Alle anderen Messwerte zeigten nur irrelevante Abweichungen gegenüber dem Zeitpunkt vor Intoxikation.

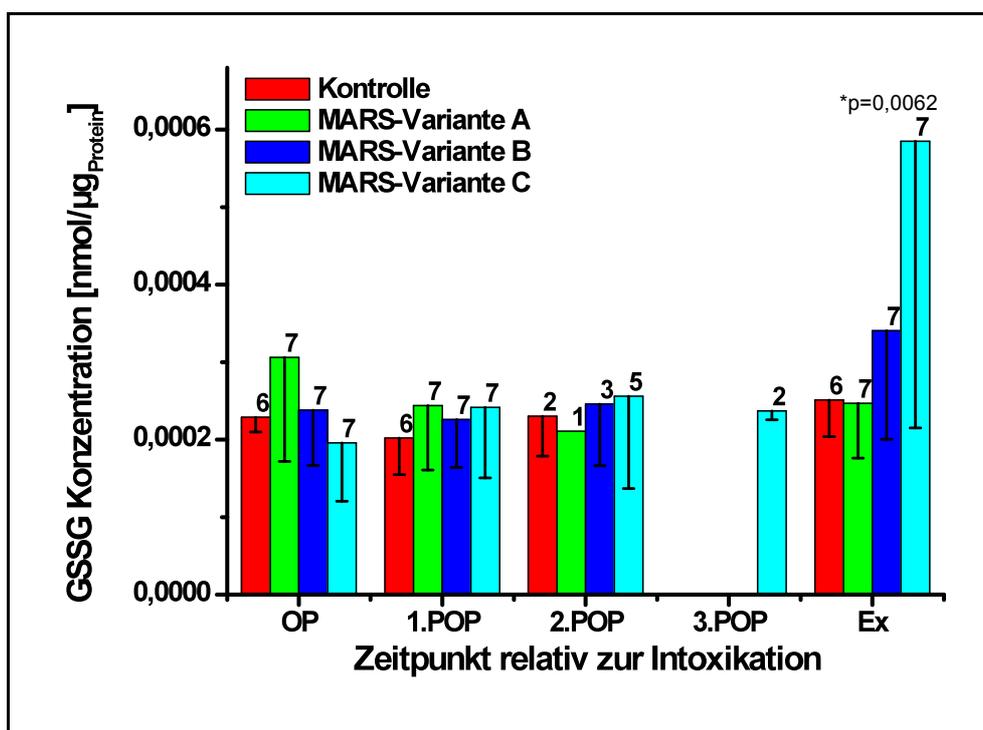


Abb.3.23: Konzentrationen von GSSG in den Therapiegruppen. Die ermittelten GSSG-Konzentrationen wurden je nach Therapie gegen den Zeitpunkt der Intoxikation aufgetragen. Anhand des Dunnett's Tests wurde auf signifikante Veränderungen getestet. Die Anzahl *n* der Messwerte ist über den Balken indiziert. Die Werte sind angegeben in MW ± S.

3.3 NAD/NADH-Gehalt im Lebergewebe

Die Betrachtung der NAD- und NADH-Konzentrationen ergab weder für die einzelnen Therapien (siehe Abb.3.24) noch für die einzelnen Zeitpunkte nach Intoxikation eine signifikante Abweichung der Messwerte vergleichend zum Zeitpunkt der PCM-Gabe.

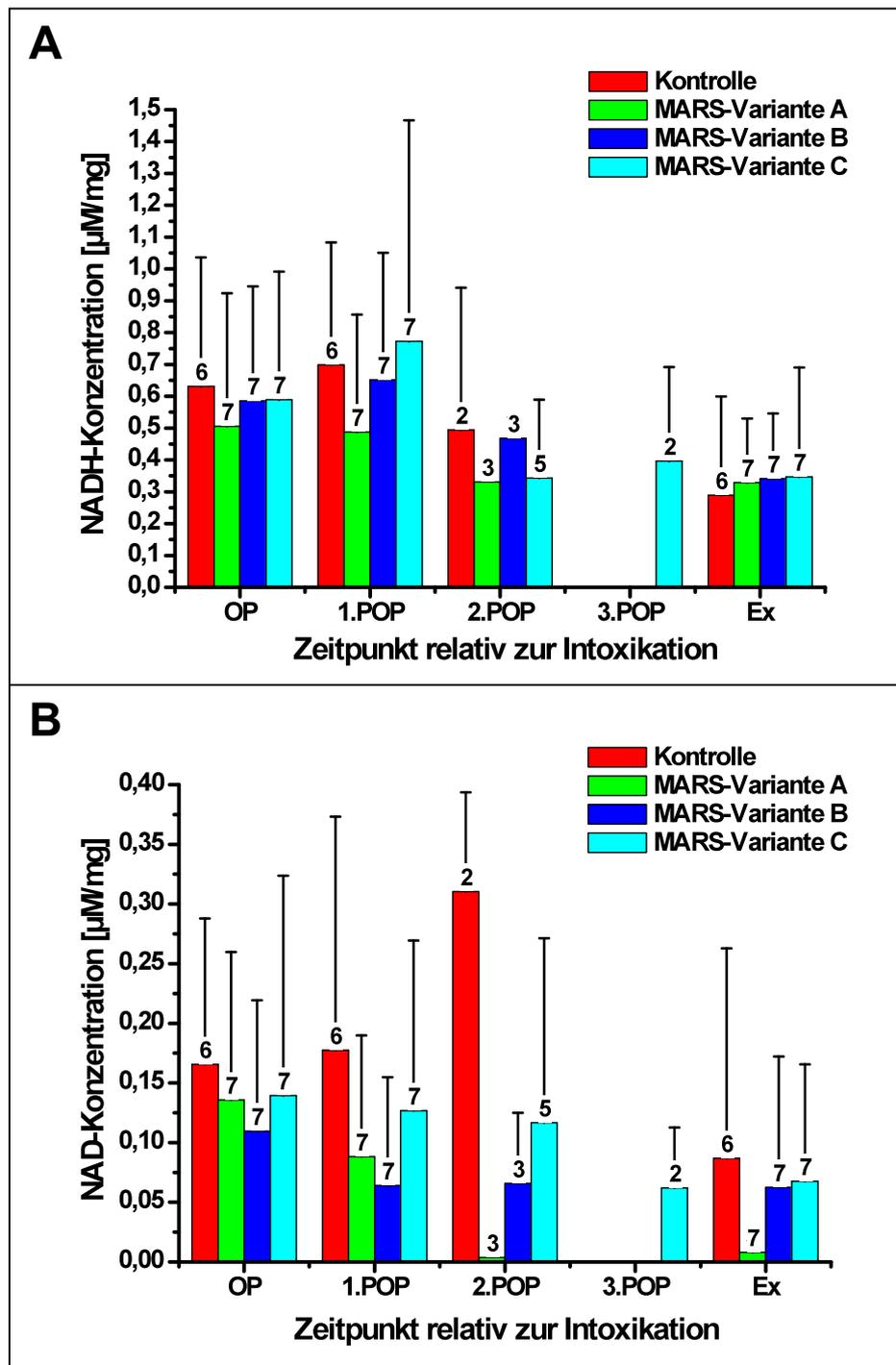


Abb.3.24: NAD- und NADH-Konzentrationen der Leberbiopsie-Proben. Die Gewebeprouben wurden aufgearbeitet und auf die Auswaage normiert. Anschließend wurde die NAD- bzw. die NADH-Konzentration bestimmt und die MW \pm S der jeweiligen Therapiegruppe gegen den Zeitpunkt relativ zur Intoxikation aufgetragen. Die Anzahl der Messwerte n ist in der Abbildung über den Balken indiziert. **A:** NADH-Konzentrationen **B:** NAD-Konzentrationen

4 Diskussion

Grundlage für die Erfassung aller Daten war die Entwicklung eines Tiermodells zur Induktion eines akuten Leberversagens durch PCM. Die bezüglich der Entwicklung eines solchen Modells formulierten Kriterien von Terblanche und Hickman, als auch die weiterführende Definition von Filipponi und Mosca sollten hierbei weitestgehend eingehalten werden (25;83).

Die Standards des Tierschutzes wurden zu jeder Zeit eingehalten, ebenso wurde im Umgang mit den Tieren stets nach ethischen Grundsätzen gehandelt.

Aufgrund seiner Größe wurde das Schwein als Modelltier gewählt, da hier eine Vergleichbarkeit der klinischen Parameter mit dem Menschen hinsichtlich Metabolismus und Kreislaufsystem sowie der Organgröße gegeben ist. Außerdem kann bei diesem Tier sowohl die für Krankheitsverlauf und Tod gefundene Situation in der Klinik, als auch die dort übliche intensivmedizinische Überwachung, Pflege und Behandlung weitestgehend nachempfunden werden. Zudem ist eine Gewinnung von Blut- und Lebergewebeproben in großem Umfang und über einen längeren Zeitraum hinweg möglich, ohne den Gesundheitszustand der Tiere zu beeinträchtigen.

Das Leberversagen wurde durch die Applikation von PCM erreicht, da die Induktion durch ein Toxin im Gegensatz zu den bisher publizierten chirurgischen Möglichkeiten, wie der Leberresektion (24;34), potentiell reversibel ist.

Als ungefährliche Substanz wurde PCM als Toxin gewählt, da es durch seine hohe klinische Relevanz der Beantwortung der Fragestellung am Besten entsprach. Außerdem stellt diese Substanz keine Gefährdung für das Personal dar.

Die i. v. Verabreichung von PCM hat laut Literatur oft einen frühzeitigen MethHb-Anstieg zur Folge, der noch vor Entwicklung einer ernstzunehmenden Leberschädigung letal ist (5;68). Diese Problematik war in der Dosisfindungsphase bei sehr hohen oralen PCM-Dosen ebenfalls zu beobachten. Dagegen wurden durch eine Applikation direkt in den Darm gute Ergebnisse erzielt (59). Diese Methode hat zwar einen längeren Zeitraum zwischen Vergiftung und Symptomausprägung zur Folge, kommt jedoch der klinischen Situation sehr nahe. Die

Positionierung der Sonde im oberen Jejunum erwies sich in dieser Studie als sehr wirkungsvoll und wichtig für die Optimierung des Modells.

Die passende PCM-Dosis sollte in jedem Fall letal sein, jedoch auch ein ausreichendes therapeutisches Fenster bieten, um eine Entwicklung der für das Krankheitsbild typischen Symptome zu erhalten und die Dialyse-Geräte auf ihre Wirksamkeit hin testen zu können. Durch eine Einmalgabe konnten diese Vorgaben nicht erfüllt werden, da entweder eine Regeneration der Leberfunktion ohne Erreichen eines totalen Funktionsverlustes der Leber, oder aber ein zu fulminantes Leberversagen eintrat, welches die Tiere sehr früh versterben ließ. Dies führte im Folgenden dazu, dass nach einem Initialbolus eine stündliche Erhaltungsdosis gegeben wurde. Die gewünschte PPK von 300-450 mg/l wurde innerhalb von 12 Stunden erreicht und bis zum Eintritt des LV möglichst konstant im gewünschten Bereich gehalten. Die Variierung der Erhaltungsdosis ermöglichte es, individuelle Unterschiede hinsichtlich der Verträglichkeit und der Metabolisierung von PCM weitgehend auszublenden und stellte sich als zuverlässige Technik heraus. Die Korrelation zwischen INR und PPK bestätigten, dass der Eintritt des Leberversagens auf die Gabe des Toxins zurückzuführen war.

Diverse Arbeitsgruppen beschäftigten sich bereits mit vergleichbaren Modellen, sie scheiterten jedoch alle an der Reproduzierbarkeit des LV (26;32;44).

Das hier beschriebene Großtier-Modell stellte sich als reproduzierbar und zuverlässig heraus, da sowohl die Krankheitssymptome des ALV, wie Anämie, Koagulopathie und zunehmende renale Insuffizienz, als auch der Tod durch Multiorganversagen und/oder durch ein zerebrales Ödem der in der Klinik gefundenen Situation entsprachen. Der Zeitraum bis zum Eintritt des LV, die Leberschädigung und die Überlebensdauer im LV waren gut reproduzierbar. Darüber hinaus ließ die Dauer des LV den Einsatz von artifiziellen LEV zu. Durch dieses therapeutische Fenster konnte nun der Beitrag der unterschiedlichen Geräte zum Gesundheitszustand der Tiere untersucht und verglichen werden. Entgegen publizierter Meinungen (32;33) war es möglich, ein reproduzierbares Tiermodell für das PCM-induzierte ALV am Schwein als Modellorganismus zu

etablieren, welches alle geforderten Kriterien erfüllt und somit als nahezu ideal bezeichnet werden kann. Trotz der hier gezeigten Ergebnisse soll darauf hingewiesen werden, dass bei einem so komplexen und herausfordernden Krankheitsbild wie dem ALV keine standardisierte Behandlung möglich ist, da ebenso wie in der Klinik der individuelle Krankheitsverlauf der Tiere individuell zu entscheidende Behandlungsschritte erfordert.

Die Entwicklung eines Leberversagens bringt außer den definierenden Veränderungen wie Koagulopathie und Enzephalopathie eine Vielzahl weiterer Symptome mit sich. Angefangen bei objektiv nicht messbaren Symptomen wie Übelkeit, Inappetenz, Schwäche etc. kann ein Verlust der Leberfunktion u. a. Kreislaufversagen, Niereninsuffizienz, Ödembildung, Lungenfunktionsstörungen und die Entwicklung einer Sepsis nach sich ziehen (64;71).

Eine Koagulopathie war bei allen Tieren deutlich nachweisbar. Die PTT stieg bei allen Tieren deutlich an und die INR als definierender Faktor für das Leberversagen erreichte in jedem Fall Werte über 1,5. Als Folgen eines Leberausfallskomas wiesen die Tiere außerdem einen Abfall des Albumins und eine Thrombozytopenie auf. Bis zum Eintritt des LV waren die Hb-Werte der Tiere auf ähnlichem Niveau, eine gewisse Dynamik ist durch eine eventuelle EK-Substitution zum MARS-Therapiestart hin erklärbar.

Eine Betrachtung der hämodynamischen Situation und der Beatmungsparameter der Studientiere zeigte deutlich die erwarteten klassischen Folgen der Entwicklung eines ALV. Der durch den Albuminmangel bedingte niedrige intravasale kolloidosmotische Druck führte zu einem intravasalen Flüssigkeitsverlust und war somit der Grund für den relativen Volumenmangel der Tiere, der sich trotz einer gesteigerten Voluven- und Arterenol- Substitution in einer steigenden HF und einem Abfall des MAP äußerte. Ebenso begründete dieser Umstand die Entwicklung von Ödemen an Extremitäten und in der Lunge, welche die Beatmung zunehmend anspruchsvoller und unphysiologischer werden ließen.

Das Laktat als unspezifischer Parameter entsteht generell bei der anaeroben Zellatmung und ist schnell im Blut nachweisbar. Unter normalen Umständen wird es bei ausreichender Oxygenierung umgehend wieder abgebaut. Steigt

das Laktat dauerhaft an, spricht es für eine anhaltende Sauerstoffschuld und hat so negative Auswirkungen u. a. auf den Blut-pH, was im schlimmsten Fall zu einer nicht behebbaren Laktat-Azidose führen kann. Bei den Studientieren stieg das Laktat ab ca. 8 Stunden vor LV leicht an und rechtfertigt somit auch die steigenden Beatmungsdrücke und die Notwendigkeit, die Tiere mit immer höheren FiO_2 -Konzentrationen zu beatmen.

Als weitere Folge der Kreislaufdysfunktion entwickelte sich bei den Tieren eine Niereninsuffizienz bis hin zum Hepatorenalen Syndrom (HRS). Grundlegend kommt es hier durch die renale Minderperfusion zu ischämischen Zuständen, was sich in renaler Vasokonstriktion auswirkt und mindernd für die glomeruläre Filtrationsrate ist (88). Entsprechend sank bei allen Tieren kontinuierlich die Ausscheidungsmenge bis hin zur Anurie. Beweisend für ein HRS Typ 1, wie es auch bei den Studientieren vorkam, ist ein starker Anstieg von Harnstoff, Stickstoff und Kreatinin, welches oftmals über 2,5 mg/dl in weniger als 2 Wochen ansteigt. Außerdem müssen andere mögliche Ursachen für eine Niereninsuffizienz, wie Schock, Sepsis und Flüssigkeitsverlust ausgeschlossen sein. Ein Anstieg von Harnstoff und Kreatinin war bei allen Tieren gegeben, als Sepsisprophylaxe wurde Ceftriaxon gegeben und der konstant hohe ZVD ließ den Ausschluss eines Flüssigkeitsverlustes zu. Zudem wurde bei Bedarf Lasix verabreicht um die Diurese aufrecht zu halten, was jedoch nur begrenzte Zeit möglich war.

Die Ansammlung von Stickstoffkomponenten im Blut, wie dies auch bei einem Kreatininanstieg der Fall ist, ist zwar normalerweise reversibel, eine Verbesserung der Nierenfunktion kann jedoch erst nach 7-10 Tagen beobachtet werden (8) und war somit innerhalb dieser Studie nicht möglich.

Ebenfalls Zeichen einer Leberschädigung ist eine Erhöhung der Transaminasen GOT und GPT. Bis zum Eintritt des LV blieb die GOT auf dem Niveau der Ausgangswerte, während die GPT absank, was nicht der erwarteten Parameterentwicklung entsprach.

Obwohl sie in mehreren Organen vorkommt, stammt die im Blut messbare GGT praktisch nur aus der Leber, besonders aus den Gallengangszellen. Als emp-

findlichster Leber-Parameter weist eine erhöhte Serumkonzentration praktisch immer auf eine Schädigung der Hepatozyten und/oder der Gallengangszellen hin und kann bei geringfügigen Schäden auch der einzige Hinweis im Blut sein. Auch hier entwickelten sich die Werte nicht nach oben, sondern sie fielen zunächst bis zum Eintritt des LV bei allen Tieren ab, was ebenfalls in dieser Form nicht zu erwarten war.

Ein unspezifischer Marker für Zelluntergang im Organismus ist die LDH. Durch die progrediente Leberzellnekrose ist somit auch ein Anstieg dieser zu erwarten. Bis zum Eintritt des LV fiel die messbare Konzentration der LDH leicht ab, was nicht erwartet wurde und auch nicht befriedigend erklärt werden kann.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung dreier artifizierender LEV hinsichtlich ihres Beitrages zum AZ der Tiere. Die MARS-Variante A-Therapie befindet sich bereits in klinischem Einsatz und prospektive Studien berichten von einer Zustandsstabilisierung der Patienten durch ihren Einsatz (63). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Testung dieses MARS-Systems gegen zwei MARS-Prototypen und eine Kontrollgruppe. Die erhaltenen Daten zeigen jedoch teilweise konträre Befunde zur Literatur.

Als wichtigste Erkenntnis ist wohl der Unterschied der Überlebensdauer der Schweine im Leberversagen in den verschiedenen Behandlungsgruppen zu bewerten. Betrachtet man die mittlere Dauer des LV, lagen die Tiere, die mit dem MARS-Variante A-Verfahren therapiert wurden, deutlich unter denen der Kontrollgruppe, womit der Nutzen der Therapie hinterfragt werden sollte. In diesem Punkt waren die MARS-Variante B-Tiere mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Die MARS-Variante C-Therapie brachte den Tieren einen Überlebensvorteil von rund 8 Stunden. Da für diese Therapie eine MARS-Dialyse mit einer NAC-Gabe kombiniert wurde, ist eine Aussage zum jeweiligen Teil der Therapie schwierig. In der Literatur wird die Infusion von NAC im Tiermodell sehr unterschiedlich bewertet. Einerseits wird von einer positiven Entwicklung des Zustandes berichtet, andererseits wird die Meinung vertreten, dass eine NAC-Applikation nach einer Intoxikationszeit von länger als 5 Stunden keinen Effekt

hat (31;58). Die Untersuchung bezüglich des jeweiligen Benefits sollte zukünftig noch unabhängig voneinander untersucht werden, um hier eine valide Aussage treffen zu können.

Ein bedeutender Unterschied der MARS-Therapien zur Kontrolltiergruppe ist ein starker Abfall der Körperkerntemperatur während der 6-stündigen Dialysedauer. Diese Entwicklung ist zwar grundsätzlich kritisch zu betrachten, jedoch ist auch ein Vorteil für das neurologische Outcome möglich, wie es beim Schlaganfall vermutet wird. Hier wird das Herabsetzen der Körpertemperatur zur Verbesserung des neurologischen Ergebnisses bereits in klinischen Studien untersucht, wobei der Beweis der Wirksamkeit noch erbracht werden muss (21).

Hinsichtlich der Katecholamin-Gabe fällt ein deutlich höherer Bedarf der Kontrolltiere auf. Außerdem wurde den Kontroll- und den MARS-Variante A-Tieren pro Stunde LV deutlich mehr Voluven infundiert, als den Tieren der anderen beiden Therapie-Gruppen. Eine Zustandsstabilisierung hinsichtlich der Kreislaufsituation durch die MARS-Behandlung ist somit nicht uneingeschränkt zu bestätigen.

Die Analyse der Laborparameter auf mögliche Ursachen für die Unterschiede der Überlebenszeiten ergab in erster Linie einen niedrigen Hb bei allen Studientieren. Sowohl im Tiermodell als auch in der Klinik sind schwerwiegende Anämien nach PCM-Intoxikation bereits bekannt, wurden jedoch als direkte Todesursache ausgeschlossen (15;59).

Bei differenzierter Betrachtung nahm der Hb sowohl bei der MARS-Variante A- als auch bei der MARS-Variante C-Behandlung trotz erhöhter EK-Substitution während der Therapie stärker ab als bei den anderen Gruppen. Da bei den Varianten A und C dieselbe Hohlfasermembran zur Vollblutfiltration verwandt wurde, ist ein Zusammenhang zwischen zunehmender Anämie und Filtersystem naheliegend. Die Tiere der MARS-Variante B-Gruppe hingegen hatten trotz insgesamt weniger EKs die höchsten Hb-Werte. Die hier verwendete Hohlfasermembran enthält einen Hydrogencarbonatpuffer, welcher die Integrität der

Erythrozyten zumindest nicht negativ zu beeinflussen scheint. Da die Abnahme des Hb in neuester Zeit als wichtiger Parameter zur Abschätzung des Krankheitsverlaufes herangezogen wird (15), können die MARS-Variante A- und die MARS-Variante C-Therapie in diesem Punkt nicht positiv bewertet werden.

Bei einer andauernden Leberschädigung kann von einer Verbrauchskoagulopathie ausgegangen werden. Hier zeigte sich ein weiterer Vorteil der MARS-Variante C-Therapie gegenüber den anderen Behandlungsformen. Während die Thrombozytenzahl bei allen Gruppen ähnlich war, blieb die INR der MARS-Variante C-Tiere nach einem geringen Anstieg zum Exitus hin zwar nicht signifikant, aber dennoch deutlich unter der INR aller anderer Tiere. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Konzentration von Gerinnungsfaktoren im Blut durch die Albumin-Dialyse negativ beeinflusst wird. Grundsätzlich wäre eine Wechselwirkung der Proteine mit der Aktivkohle und/oder dem Ionenaustauscher denkbar. Diesbezüglich wurden im Rahmen dieser Studie jedoch keine Proben gewonnen, weshalb eine explizite Untersuchung dieses Sachverhalts nicht möglich war.

Wie bereits angesprochen entwickelten alle Tiere ein HRS, welches bei den MARS-Variante C-Tieren jedoch weniger stark ausgeprägt war, da hier vor Exitus eine wiederansteigende Diurese zu beobachten war.

Ein Ziel der MARS-Dialyse war die Entfernung wasserlöslicher Substanzen, wie z.B. Kreatinin und Harnstoff. Die Konzentrationen dieser Nierenparameter zeigten für die MARS-Variante A und B zum Zeitpunkt des Exitus signifikant niedrigere Werte verglichen mit den Kontroll- und den MARS-Variante C-Tieren. Dies spricht eindeutig für die Effektivität der Albumin-Dialyse hinsichtlich der Entfernung dieser Substanzen.

Bezüglich der Eliminierung albumingebundener Stoffe, wie z.B. Bilirubin, kann hier keine Aussage getroffen werden, da beim Schwein im Gegensatz zum Menschen für das Krankheitsbild des ALV kein Anstieg dieses Parameters zu verzeichnen war.

Die vergleichende Betrachtung der Leberwerte GGT, GOT und GPT im Leberversagen für die verschiedenen Therapieformen ergab teilweise überraschende

Ergebnisse. Für die GGT als einen der sensitivsten Parameter für eine Leberschädigung wäre ein fulminanter Anstieg zu erwarten gewesen. Stattdessen lässt sich nur ein leichter Anstieg vermerken, der in keinem Verhältnis zum Ausmaß der Leberschädigung steht, da sich die Werte maximal grenzwertig hoch im Referenzbereich befinden. Auch die Entwicklung der GPT-Werte ist unerwartet, da hier zunächst ein nicht erklärbarer Abfall der Konzentrationen zu bemerken war. Der anschließende Anstieg der Werte, der bei den MARS-Variante A- und C-Tieren gegenüber den Kontrolltieren früher stattfand, lässt einen negativen Einfluss dieser Behandlungsformen auf die Zellintegrität vermuten, wobei auch hier die Werte maximal grenzwertig hoch waren. Einzig die gemessenen GOT-Konzentrationen entwickelten sich wie erwartet, wobei auch hier ein früherer starker Anstieg der Werte bei den MARS-Variante A- und C-Tieren zu beobachten war, was auch gegen einen förderlichen Einfluss dieser Therapien auf den Zustand der Zellen spricht.

Nach einem zunächst unerwarteten Abfall zeigte sich für die LDH-Konzentration ein deutlicher Anstieg der Werte, der verglichen mit den MARS-Tieren bei den Kontrolltieren später einsetzte. Auch hier war kein positiver Effekt der Therapien zu verzeichnen.

Das Laktat stieg ab 8 Stunden vor LV kontinuierlich stark an und zeigt somit die erwartete Dynamik. Zwischen den einzelnen Therapiegruppen konnte jedoch kein relevanter Unterschied der Messwerte beobachtet werden.

Generell ist jedoch festzustellen, dass nicht alle Parameter innerhalb des Versuchszeitraums eskalierten und sich die Messwerte meist im Normalbereich befanden. Ein Erklärungsansatz hierfür kann in der relativ kurzen Überlebensdauer der Studientiere gefunden werden.

Um das erhaltene Bild über die jeweiligen Therapiegruppen zu verfeinern und noch genauere Einblicke zu erhalten, wurden die gewonnenen Leberbiopsieproben auf ihren Glutathiongehalt hin untersucht. Die Analyse des 24 Stunden nach Intoxikation erhaltenen Gewebes zeigte unabhängig von der Therapiegruppen-Zugehörigkeit eine deutliche Dezimierung der GLU-Konzentration, was laut Literatur auf die Konjugation von GSH mit dem reaktiven Stoffwechselpro-

dukt NAPQI zurückzuführen ist (28;37;40;60;61). Bei den Biopsieproben der darauf folgenden Tage konnte für keine der Behandlungsgruppen eine Veränderung dieses Zustandes festgestellt werden, was die Beurteilung der Therapiegruppe aufgrund ihres klinischen Zustandes bestätigte. Ein abweichendes Verhalten wurde auch hier nur bei den MARS-Variante C-Tieren festgestellt, welche ab Therapie-Beginn eine signifikante Steigerung des Gehalts an GSH und bei Exitus auch signifikante Mengen von GSSG aufzeigten.

Der deutliche Anstieg an GSSG um den Zeitpunkt des Exitus deutet klar auf oxidativen Stress in der Leber hin, welcher mit hepatozellulärer Nekrose, daraus resultierender Inflammation und dem Vorhandensein von ROS in Zusammenhang steht. Dieser Zustand ist mit dem Zeitpunkt des Exitus gut vereinbar. Ob nun die Nekrose oxidativen Stress verursacht, oder oxidativer Stress die Nekrose, kann durch die hier gezeigten Ergebnisse nicht geklärt werden und bleibt weiterhin Gegenstand derzeitiger Forschung (36).

Wiederholt stellt sich die Frage, auf welchen Anteil der MARS-Variante C-Therapie sich die oben angesprochenen Unterschiede begründen. In der Literatur wird NAC als Cysteindonor beschrieben (18;19;93) und soll im Allgemeinen sowohl im Tiermodell als auch in der Zellkultur positiv für den Gesamtzustand sein (31;58). Das legt die Vermutung nahe, dass die NAC-Applikation in direktem Zusammenhang mit einer Steigerung der GLU-Konzentration steht. Im Gegensatz hierzu wurde im Mausmodell gezeigt, dass eine NAC-Applikation bei länger bestehender Intoxikation nicht effektiv vor Leberschädigung schützt. Außerdem wurde ein Wiederanstieg des GSH-Gehalts und darauffolgend ein Anstieg von GSSG nach einer initialen Depletion durch NAPQI auch ohne die vorherige Verabreichung eines Antidots beschrieben (36;67;85). Abgesehen von dem unklaren Beitrag der NAC-Gabe zum Ausgang der Studie sprechen die nicht nennenswerten Veränderungen der GLU-Konzentrationen der unterschiedlichen Behandlungsformen jedoch eindeutig gegen diese Erkenntnisse.

Die Leber als multifunktionales Organ spielt eine essentielle Rolle in Metabolismus, Exkretion und Entgiftung, wobei alle Prozesse Energie in Form von Re-

duktionsäquivalenten benötigen (56). Aus diesem Grund wurden neben der Glutathionkonzentration auch die NADH- und die NAD-Konzentrationen bestimmt und auf Veränderungen hin untersucht. In der Literatur wurden bereits sowohl eine NAD-Depletion bei PCM-Intoxikation (35;48;66), als auch eine Verringerung der NADH-Konzentration gezeigt (47). Dennoch war es überraschend, dass bei der Analyse der Messwerte weder konkrete Ergebnisse noch Trends beobachtet werden konnten. Dies könnte in der Vorbereitung der Proben oder in der Messmethode begründet sein. Da jedoch diese Vorgänge auch in der Literatur gegensätzlich beschrieben werden, ist eine genaue Erklärung an dieser Stelle nicht möglich.

Insgesamt ist zu berichten, dass im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Leberschädigung und der Dauer der anhepatischen Phase bei einer PCM-Intoxikation am Schwein als Modellorganismus gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Das so entstandene Großtiermodell ermöglichte durch sein therapeutisches Fenster die Testung von extrakorporalen LEV, deren Einsatz jedoch keinen durchweg positiven Beitrag zum Gesundheitszustand der Studientiere zeigte. Hierbei nahm die MARS-Variante C als kombinierte Therapie mit einem Antidot eine Sonderstellung ein und war somit nur begrenzt zu bewerten.

5 Zusammenfassung

PCM ist ein weit verbreitetes Antipyretikum und Analgetikum, von dem seit Jahren bekannt ist, dass es bei Überdosierung lebertoxisch wirkt und zu einem ALV, schlimmstenfalls bis zum Tode führen kann. Trotz großer Bemühungen war es bislang nicht möglich, die genauen Zusammenhänge der Toxizität zu klären, was eine zuverlässige Prognose des Krankheitsverlaufs bei einer Überdosierung erschwert. Nicht unbeteiligt hieran ist der Mangel an suffizienten Großtiermodellen, die es sowohl erlauben, Krankheitsbild und Behandlung mit der klinischen Situation zu vergleichen, als auch genauere Einblicke in die Initiation der Toxizität zu gewähren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, ein aussagekräftiges Tiermodell hinsichtlich des PCM-induzierten ALV zu entwickeln, um daran artifizielle LEV klinisch auf ihre Relevanz hin untersuchen zu können.

Zur Etablierung eines Tiermodells wurde bei 28 Schweinen mit der Gabe eines initialen Bolus und anschließender stündlicher Erhaltungsdosis von PCM unter maximaler intensivmedizinischer Überwachung ein ALV induziert. Nach Eintritt des LV wurden an den blockrandomisierten Studientieren ihrer Gruppenzugehörigkeit entsprechend die unterschiedlichen Dialyseverfahren geprüft. Zu jeder Zeit wurden Vital- und Blutparameter aufgezeichnet bzw. bestimmt und regelmäßig Keilbiopsien der Leber entnommen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein suffizientes Großtiermodell eines PCM-induzierten ALV am Schwein zu etablieren, welches für die Leberschädigung und die Dauer des LV reproduzierbare Ergebnisse gezeigt hat.

Die in dieser Studie getesteten LEV zeigten jedoch nur geringen therapeutischen Erfolg. Während verglichen zur Kontrollgruppe die MARS-Variante A-Tiere eine wesentlich kürzere Überlebensdauer aufwiesen, wurde für die MARS-Variante B-Therapie zwar kein negativer Beitrag zum AZ der Tiere festgestellt, aufgrund mangelnder positiver Entwicklungen ist jedoch der Nutzen

und somit der Einsatz dieser Therapieverfahren kritisch zu hinterfragen. Eine Sonderstellung nimmt hierbei die MARS-Variante C-Therapie ein, da sie zwar einen erheblichen Überlebensvorteil für die Tiere aufwies, dieser jedoch aufgrund der Kombination mit NAC nicht eindeutig dem Dialyseverfahren zuzuschreiben ist. Es ist daher empfehlenswert, diese Therapie nochmals gesondert auf ihren Beitrag zum Gesundheitszustand hin zu untersuchen.

Die Analyse der Leberbiopsien hinsichtlich der GLU-Konzentration ergab für diese in erster Linie eine drastische Depletion nach Intoxikation. Einzig die MARS-Variante C-Gruppe zeigte ab dem 2. POP einen nennenswerten Wiederanstieg von GLU, der sehr wahrscheinlich auf die Applikation von NAC zurückzuführen war. Dieser Umstand hebt erneut die Sonderstellung der MARS-Variante C-Therapie hervor und bestätigt die Notwendigkeit der getrennten Untersuchung des Dialyse-Systems.

Abschließend ist festzustellen, dass dieses Großtiermodell zukünftig nicht nur die Möglichkeit eröffnet, neue Einblicke und ein genaueres Verständnis der PCM-Intoxikation zu gewinnen, sondern es erlaubt zusätzlich eine aussagekräftige Überprüfung innovativer LEV in einer mit der Klinik vergleichbaren Situation. Eine intensivere Erforschung des ALV ermöglicht die Entwicklung verbesserter therapeutischer Ansätze und trägt dazu bei, dem Ziel, dieses Krankheitsbild ohne Transplantation kurativ behandeln zu können, näher zu kommen.

6 Literatur

- (1) Acetaminophen toxicity in children. *Pediatrics* 2001 Oct;108(4):1020-4.
- (2) Akdogan M, Camci C, Gurakar A, Gilcher R, Alamian S, Wright H, et al. The effect of total plasma exchange on fulminant hepatic failure. *J Clin Apher* 2006 Jul;21(2):96-9.
- (3) Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, Moldeus P. Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol Pharmacol* 1985 Sep;28(3):306-11.
- (4) Andersson BS, Rundgren M, Nelson SD, Harder S. N-acetyl-p-benzoquinone imine-induced changes in the energy metabolism in hepatocytes. *Chem Biol Interact* 1990;75(2):201-11.
- (5) Artwohl JE, Henne-Bruns D, Carter E, Cera LM. Acetaminophen toxicosis: a potential model for acute liver failure in swine. *Vet Hum Toxicol* 1988 Aug;30(4):324-8.
- (6) Ash SR, Sullivan TA, Carr DJ. Sorbent suspensions vs. sorbent columns for extracorporeal detoxification in hepatic failure. *Ther Apher Dial* 2006 Apr;10(2):145-53.
- (7) Bajt ML, Knight TR, Lemasters JJ, Jaeschke H. Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. *Toxicol Sci* 2004 Aug;80(2):343-9.
- (8) Blakely P, McDonald BR. Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: a case report and review of the literature. *J Am Soc Nephrol* 1995 Jul;6(1):48-53.
- (9) Blei AT. Selection for acute liver failure: have we got it right? *Liver Transpl* 2005 Nov;11(11 Suppl 2):S30-S34.
- (10) Canbay A, Chen SY, Gieseler RK, Malago M, Karliova M, Gerken G, et al. Overweight patients are more susceptible for acute liver failure. *Hepatogastroenterology* 2005 Sep;52(65):1516-20.
- (11) Canbay A, Jochum C, Bechmann LP, Festag S, Gieseler RK, Yuksel Z, et al. Acute liver failure in a metropolitan area in Germany: a retrospective study (2. *Z Gastroenterol* 2009 Sep;47(9):807-13.
- (12) Chamuleau RA, Poyck PP, van de Kerkhove MP. Bioartificial liver: its pros and cons. *Ther Apher Dial* 2006 Apr;10(2):168-74.
- (13) Chen C, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer

- analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice. *J Biol Chem* 2008 Feb 22;283(8):4543-59.
- (14) Cullen JM. Mechanistic classification of liver injury. *Toxicol Pathol* 2005;33(1):6-8.
 - (15) Dabos KJ, Newsome PN, Parkinson JA, Davidson JS, Sadler IH, Plevris JN, et al. A biochemical prognostic model of outcome in paracetamol-induced acute liver injury. *Transplantation* 2005 Dec 27;80(12):1712-7.
 - (16) Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 Mar;81(5):1327-31.
 - (17) Dargan PI, Jones AL. Acetaminophen poisoning: an update for the intensivist. *Crit Care* 2002 Apr;6(2):108-10.
 - (18) DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991 Dec;52(3):287-305.
 - (19) DeLeve LD, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995 Dec;24(4):787-810.
 - (20) Demetriou AA, Brown RS, Jr., Busuttill RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004 May;239(5):660-7.
 - (21) Den Hertog HM, van der Worp HB, Tseng MC, Dippel DW. Cooling therapy for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1):CD001247.
 - (22) Escorsell A, Mas A, De La MM. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 2007 Oct;13(10):1389-95.
 - (23) Faenza S, Baraldi O, Bernardi M, Bolondi L, Coli L, Cucchetti A, et al. Mars and Prometheus: our clinical experience in acute chronic liver failure. *Transplant Proc* 2008 May;40(4):1169-71.
 - (24) Filipponi F, Boggi U, Meacci L, Burchielli S, Vistoli F, Bellini R, et al. A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery* 1999 Apr;125(4):448-55.
 - (25) Filipponi F, Mosca F. Animal models of fulminant hepatic failure: need to test liver support devices. *Dig Liver Dis* 2001 Oct;33(7):607-13.
 - (26) Gazzard BG, Hughes RD, Mellon PJ, Portmann B, Williams R. A dog model of fulminant hepatic failure produced by paracetamol administration. *Br J Exp Pathol* 1975 Oct;56(5):408-11.

-
- (27) Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 1980 Jul 15;106(1):207-12.
- (28) Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 2002 Jun;67(2):322-8.
- (29) Harman AW, Kyle ME, Serroni A, Farber JL. The killing of cultured hepatocytes by N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) as a model of the cytotoxicity of acetaminophen. *Biochem Pharmacol* 1991 Apr 15;41(8):1111-7.
- (30) Heard KJ. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N Engl J Med* 2008 Jul 17;359(3):285-92.
- (31) Henderson NC, Pollock KJ, Frew J, Mackinnon AC, Flavell RA, Davis RJ, et al. Critical role of c-jun (NH2) terminal kinase in paracetamol-induced acute liver failure. *Gut* 2007 Jul;56(7):982-90.
- (32) Henne-Bruns D, Artwohl J, Broelsch C, Kremer B. Acetaminophen-induced acute hepatic failure in pigs: controversial results to other animal models. *Res Exp Med (Berl)* 1988;188(6):463-72.
- (33) Henne-Bruns D, Artwohl J, Dziwisch L, Kremer B. [Paracetamol poisoning in a swine model]. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe* 1988;21(5):255-63.
- (34) Hickman R, Dent DM, Terblanche J. The anhepatic model in a pig. *S Afr Med J* 1974 Feb 13;48(7):263-4.
- (35) Jacob M, Mannherz HG, Napirei M. Chromatin breakdown by deoxyribonuclease1 promotes acetaminophen-induced liver necrosis: an ultrastructural and histochemical study on male CD-1 mice 13. *Histochem Cell Biol* 2007 Jul;128(1):19-33.
- (36) Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 2006 Jan;89(1):31-41.
- (37) Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002 Feb;65(2):166-76.
- (38) Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2003 Oct 15;144(3):279-88.
- (39) James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 2003 Dec;31(12):1499-506.

-
- (40) Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1973 Oct;187(1):195-202.
- (41) Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* 2007 Mar;45(3):797-805.
- (42) Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001 Feb;33(2):464-70.
- (43) Kaplowitz N. Acetaminophen hepatotoxicity: what do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* 2004 Jul;40(1):23-6.
- (44) Kelly JH, Koussayer T, He DE, Chong MG, Shang TA, Whisennand HH, et al. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology* 1992 Feb;15(2):329-35.
- (45) Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985 Oct;13(10):818-29.
- (46) Knight TR, Kurtz A, Bajt ML, Hinson JA, Jaeschke H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci* 2001 Aug;62(2):212-20.
- (47) Kroger H, Dietrich A, Ohde M, Lange R, Ehrlich W, Kurpisz M. Protection from acetaminophen-induced liver damage by the synergistic action of low doses of the poly(ADP-ribose) polymerase-inhibitor nicotinamide and the antioxidant N-acetylcysteine or the amino acid L-methionine. *Gen Pharmacol* 1997 Feb;28(2):257-63.
- (48) Kroger H, Ehrlich W, Klewer M, Gratz R, Dietrich A, Miesel R. The influence of antagonists of poly(ADP-ribose) metabolism on acetaminophen hepatotoxicity. *Gen Pharmacol* 1996 Jan;27(1):167-70.
- (49) Kyle ME, Sakaida I, Serroni A, Farber JL. Metabolism of acetaminophen by cultured rat hepatocytes. Depletion of protein thiol groups without any loss of viability. *Biochem Pharmacol* 1990 Sep 15;40(6):1211-8.
- (50) Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 2005 Dec;42(6):1364-72.
- (51) Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003 Jul 31;349(5):474-85.

-
- (52) Lee WM. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 2004 Jul;40(1):6-9.
- (53) Lee WM. Acetaminophen-related acute liver failure in the United States. *Hepatol Res* 2008 Nov;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.
- (54) Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008 Apr;47(4):1401-15.
- (55) Li LJ, Zhang YM, Liu XL, Du WB, Huang JR, Yang Q, et al. Artificial liver support system in China: a review over the last 30 years. *Ther Apher Dial* 2006 Apr;10(2):160-7.
- (56) Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S31-S44.
- (57) McCloskey P, Edwards RJ, Tootle R, Selden C, Roberts E, Hodgson HJ. Resistance of three immortalized human hepatocyte cell lines to acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinoneimine toxicity. *J Hepatol* 1999 Nov;31(5):841-51.
- (58) McGregor AH, More LJ, Simpson KJ, Harrison DJ. Liver death and regeneration in paracetamol toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2003 Apr;22(4):221-7.
- (59) Miller DJ, Hickman R, Fratter R, Terblanche J, Saunders SJ. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology* 1976 Jul;71(1):109-13.
- (60) Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1973 Oct;187(1):185-94.
- (61) Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 1973 Oct;187(1):211-7.
- (62) Mitzner S, Klammt S, Stange J, Schmidt R. Albumin regeneration in liver support-comparison of different methods. *Ther Apher Dial* 2006 Apr;10(2):108-17.
- (63) Mitzner SR. Albumin dialysis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007 Nov;16(6):589-95.

-
- (64) Murray KF, Hadzic N, Wirth S, Bassett M, Kelly D. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008 Oct;47(5):395-405.
- (65) Nadalin S, Heuer M, Wallot M, Auth M, Schaffer R, Sotiropoulos GC, et al. Paediatric acute liver failure and transplantation: the University of Essen experience. *Transpl Int* 2007 Jun;20(6):519-27.
- (66) Napirei M, Basnakian AG, Apostolov EO, Mannherz HG. Deoxyribonuclease 1 aggravates acetaminophen-induced liver necrosis in male CD-1 mice. *Hepatology* 2006 Feb;43(2):297-305.
- (67) Nelson SD. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin Liver Dis* 1990 Nov;10(4):267-78.
- (68) Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl* 2000 Jan;6(1):21-31.
- (69) Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008 May;24(3):287-97.
- (70) Novelli G, Rossi M, Morabito V, Pugliese F, Ruberto F, Perrella SM, et al. Pediatric acute liver failure with molecular adsorbent recirculating system treatment. *Transplant Proc* 2008 Jul;40(6):1921-4.
- (71) O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J* 2005 Mar;81(953):148-54.
- (72) O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993 Jul 31;342(8866):273-5.
- (73) O'Grady JG, Williams R. Classification of acute liver failure. *Lancet* 1993 Sep 18;342(8873):743.
- (74) Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002 Dec 17;137(12):947-54.
- (75) Pierce RH, Franklin CC, Campbell JS, Tonge RP, Chen W, Fausto N, et al. Cell culture model for acetaminophen-induced hepatocyte death in vivo. *Biochem Pharmacol* 2002 Aug 1;64(3):413-24.
- (76) Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000 Apr;81(2):145-57.
- (77) Rahman TM, Selden AC, Hodgson HJ. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J Surg Res* 2002 Aug;106(2):264-72.

-
- (78) Reed MC, Thomas RL, Pavisic J, James SJ, Ulrich CM, Nijhout HF. A mathematical model of glutathione metabolism. *Theor Biol Med Model* 2008;5:8.
- (79) Rifai K, Manns MP. Review article: clinical experience with Prometheus. *Ther Apher Dial* 2006 Apr;10(2):132-7.
- (80) Rutherford A, Davern T, Hay JE, Murray NG, Hassanein T, Lee WM, et al. Influence of high body mass index on outcome in acute liver failure. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006 Dec;4(12):1544-9.
- (81) Sellers EM, Freedman F. Treatment of acetaminophen poisoning. *Can Med Assoc J* 1981 Oct 15;125(8):827-9.
- (82) Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisenand HH, et al. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 1992 Jul;16(1):60-5.
- (83) Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991 Jun;36(6):770-4.
- (84) Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969 Mar;27(3):502-22.
- (85) Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 1990 Feb 25;265(6):3059-65.
- (86) Tran PO, Parker SM, LeRoy E, Franklin CC, Kavanagh TJ, Zhang T, et al. Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. *J Biol Chem* 2004 Dec 24;279(52):53988-93.
- (87) Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970;3:282-98.
- (88) Turban S, Thuluvath PJ, Atta MG. Hepatorenal syndrome. *World J Gastroenterol* 2007 Aug 14;13(30):4046-55.
- (89) 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 Apr;25(9):1613-25.
- (90) Vienken J, Christmann H. How can liver toxins be removed? Filtration and adsorption with the Prometheus system. *Ther Apher Dial* 2006 Apr;10(2):125-31.

- (91) Yantorno SE, Kremers WK, Ruf AE, Trentadue JJ, Podesta LG, Villamil FG. MELD is superior to King's college and Clichy's criteria to assess prognosis in fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2007 Jun;13(6):822-8.
- (92) Zhou L, Erickson RR, Holtzman JL. Studies comparing the kinetics of cysteine conjugation and protein binding of acetaminophen by hepatic microsomes from male mice. *Biochim Biophys Acta* 1997 Apr 17;1335(1-2):153-60.
- (93) Zwingmann C, Bilodeau M. Metabolic insights into the hepatoprotective role of N-acetylcysteine in mouse liver. *Hepatology* 2006 Mar;43(3):454-63.