

Histologie der Leber im akuten Leberversagen

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

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

vorgelegt von

Dechent, Frieder

2015

Dekan: Prof. Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Königsrainer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Sipos

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Histologie der Leber.....	1
1.2 Pathologie und Verlauf des akuten Leberversagens durch Paracetamol... 3	
1.3 Regeneration der Leber und Therapie des akuten Leberversagens	5
1.4 Fragestellung	9
2 MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Material	9
2.1.1 Versuchstiere	9
2.1.2 Technische Geräte	9
2.1.3 Sonden und Katheter	10
2.1.4 Medikamente.....	10
2.1.5 MARS-Systeme.....	12
2.1.6 Histologie und Immunhistochemie der Leberbiopsien	12
2.1.7 Computerprogramme	13
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Tiermodell.....	13
2.2.1.1 Vorbereitung.....	13
2.2.1.2 Induktion des Leberversagens.....	14
2.2.1.3 Intensivmedizinische Überwachung.....	15
2.2.1.4 Intensivmedizinische Therapie.....	15
2.2.1.5 Gewinnung der Gewebeprobe.....	16
2.2.1.6 Therapiegruppen und MARS-Therapie	16
2.2.2 Aufbereitung der Leberbiopsien	17
2.2.3 Auswertung der Leberbiopsien.....	18
2.2.4 Statistik.....	24
3 ERGEBNISSE	25
3.1 Auswertung der Überlebenszeiten im Leberversagen	25
3.2 Auswertung der Nekrose:	26

3.2.1	Vergleich der Nekrose unter MARS-Therapie	28
3.2.2	Leukozytenmenge	31
3.3	Proliferationsraten der Hepatozyten	36
4	DISKUSSION.....	40
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	49
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	50
	DANKSAGUNG	II

1 Einleitung

1.1 Histologie der Leber

Histologisch baut sich die Leber aus Leberläppchen (Lobuli hepatis) auf, die einen Querdurchmesser von 1–1,5 mm und einen Längsdurchmesser von 1,5-2 mm haben und annähernd polygonal sind. Diese Leberläppchen sind von Bindegewebssepten getrennt, die in der Leber des Schweins deutlich ausgeprägt sind und dadurch die Läppchenarchitektur klar erkennen lassen (9). Die menschliche Leber ist dagegen wesentlich bindegewebsärmer und hat dadurch eine weniger deutliche Läppchenzeichnung. Der Anschluss der Läppchen an die Blutgefäße und Gallengänge erfolgt im Bereich der Periportalfelder, wo an der Stelle des Zusammentreffens mehrerer Leberläppchen bindegewebige Areale sind, in denen Äste der Pfortader, Äste der Arteria hepatica und die ableitenden Gallengänge zusammen verlaufen (9). Von den Venae interlobulares, den Ästen der Pfortader, in deren Wand noch glatte Muskelzellen liegen, gehen die Venulae interlobulares ab, die zwischen den Leberläppchen liegen und an deren Oberfläche zu einem präkapillären Netz auswachsen und von dort aus die Gefäße in die Läppchen hinein abgeben, in die Lebersinusoide, wie die Kapillaren der Leberläppchen heißen. Einen ähnlichen Verlauf nehmen die Arteriae interlobulares, die ihr Blut dann auch in die Sinusoide abgeben und somit die Sauerstoffversorgung in der Leber sichern. Diese Sinusoide laufen auf die Zentralvene zu (9).

Die Sinusoide sind vielfach miteinander anastomosierende Blutgefäße mit einer Weite von 5-15 µm. Dadurch, dass der Gesamtdurchmesser der Strombahn deutlich vergrößert wird, verlangsamt sich die Fließgeschwindigkeit des Blutes deutlich. Das Endothel ist gefenstert und hat interzelluläre Lücken, sodass die Leberzellen in direktem Kontakt mit dem Blut stehen. Zwischen diesem Endothel und den Hepatozyten befindet sich ein Spaltraum, der Disse-Raum, der im Lichtmikroskop nicht sichtbar ist. In diesen Spaltraum ragen Mikrovilli der Hepatozyten, die somit einen guten Austausch mit dem Blutplasma haben. In dem Disse-Raum lassen sich auch Fettspeicherzellen (Ito-Zellen) nachweisen (9).

Dem Endothel sitzen auf der Blutseite Makrophagen auf, die Kupffer-Zellen. Die Hepatozyten sind, wenn man sie im Verband betrachtet polygonal und können bei funktioneller Belastung auch zweikernig sein.

Weiterhin sind auch noch die Gallenkapillaren ein wichtiges Element des Lobulus. Die Wände der Gallenkapillaren werden von den Hepatozyten selbst gebildet und von den anderen Bereichen der Hepatozytenoberfläche durch Tight junctions abgetrennt, liegen also interzellulär. Die Hepatozyten können die erzeugte Galle direkt in diese Canaliculi biliferi abgeben, die von läppchenzentral in die Peripherie verlaufen und in den Glissondreiecken in die Gallengänge münden (9).

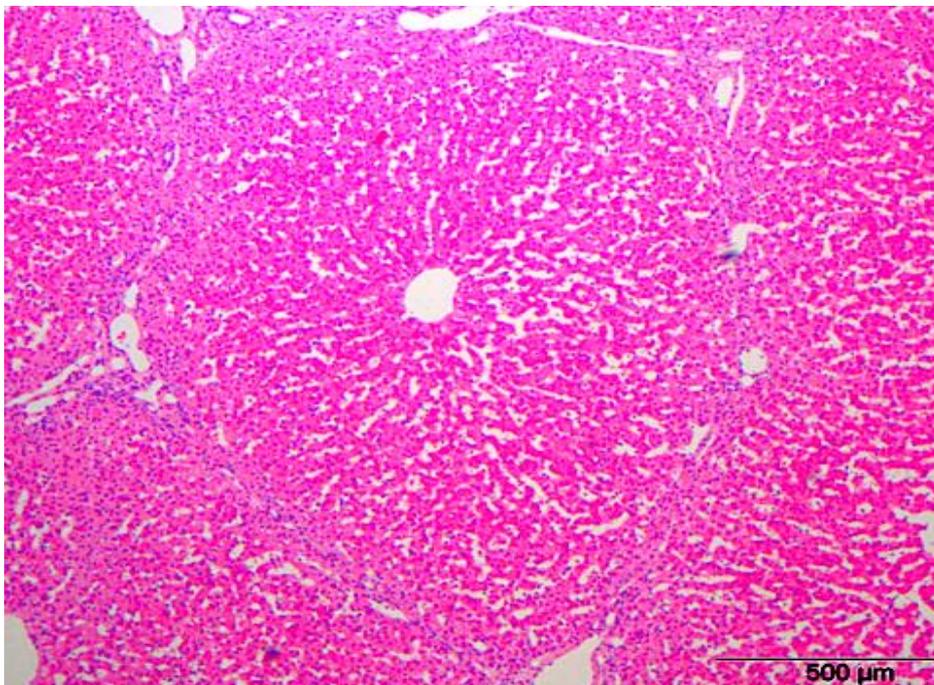


Abbildung 1: Leberläppchen mit Zentralvene und Glissonschen Dreiecken im Randbereich; HE-Färbung 100fache Vergrößerung.

Über das Leberläppchen hinaus gibt es noch andere Möglichkeiten die Leber histologisch einzuteilen, nämlich der Leberazinus, der sich zwischen je zwei Periportalfeldern und zwei Zentralvenen befindet, und das Periportalläppchen,

mit einem Periportalfeld in der Mitte und der Verbindungslinie zwischen den umliegenden Zentralvenen als Grenze.

Beim Leberazinus liegt eine Einteilung gemäß der Blutversorgung durch die Arteriolen und Venolen vor, sodass im zentralen Bereich des Azinus die beste Versorgung mit Sauerstoff besteht und in die Peripherie, entlang des Blutflusses in Richtung der Zentralvene, demgemäß die Sauerstoffversorgung schlechter wird (9; 32).

1.2 Pathologie und Verlauf des akuten Leberversagens durch Paracetamol

Bei ausgeprägter Schädigung durch Toxine kommt es zu einem Untergang der Hepatozyten sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose. Bei der Nekrose schwillt die Zelle mit den Zellorganellen, was zu einem Verlust der Membranstabilität führt. Bei der Apoptose kommt es zum Ablauf eines physiologischen Prozesses, der ein Schrumpfen der Zelle und einen anschließenden Abbau der Zelle durch Makrophagen bedingt (71).

Bei toxischer Schädigung des Hepatozyten und dessen Nekrose werden Zytokine freigesetzt, welche zu einer Akkumulation von Leukozyten, insbesondere neutrophiler Granulozyten, in den Lebersinusoiden führen. Die Leukozyten wandern in das Lebergewebe ein. Anschließend kommt es zu einer Lyse der geschädigten Zelle durch Anheftung und Degranulation des Granulozyten mittels Induktion von oxidativem Stress in der Leberzelle (29). Durch die von den neutrophilen Granulozyten in das Gewebe freigesetzten Proteasen wandern weitere neutrophile Granulozyten in das Gewebe ein (29; 57), was wiederum zu einer verstärkten Entzündungsreaktion mit vermehrter Nekrose führt. Bei schnellem Ablauf dieser Schädigung kommt es zu einem akuten Leberversagen, in dem die Leber ihre metabolischen Funktionen nicht mehr ausreichend ausführen kann.

Das akute Leberversagen ist definiert als ein Krankheitsbild, das sowohl aus einem Ausfall beziehungsweise einer schweren Störung der Leberfunktion als auch dem Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie besteht (52). Das akute

Leberversagen wird in hyperakutes Leberversagen, wobei der Zeitraum zwischen dem Auftreten des Ikterus und der Enzephalopathie weniger als sieben Tage beträgt, akutes mit einer Latenzzeit von acht bis 28 Tagen, und subakutes Leberversagen, mit einer Latenzzeit von 29 bis 84 Tagen, eingeteilt. Diese drei Gruppen unterscheiden sich durch die Häufigkeit des Auftretens eines Hirnödems und ihrer Prognose. Das hyperakute und das akute Leberversagen haben dabei eine hohe Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Hirnödems, wobei das akute Leberversagen eine geringere Überlebenschance als das hyperakute hat. Die Prognose des subakuten Leberversagens ist ebenfalls schlecht, allerdings ist hier das Hirnödem häufig nicht so vital bedrohend ausgeprägt (52). Das akute Leberversagen zeigt in der Folge häufig ein Multiorganversagen mit Kreislaufchock, Nierenversagen und respiratorischer Insuffizienz (5; 41). Durch den Ausfall der Synthesefunktion der Leber wird auch eine Koagulopathie hervorgerufen, die Komplikationen verursachen und spezielle therapeutische Maßnahmen nötig machen kann (54).

Die hepatische Enzephalopathie ist ein mit chronischem oder akuten Leberversagen beziehungsweise einem größeren portosystemischen Shunt zusammen auftretendes neuropsychiatrisches Krankheitsbild, das in die Stadien I - IV eingeteilt wird und dessen Prognose mit dem jeweiligen Stadium korreliert (72; 73).

In einer Studie, die von 2002 bis 2008 im Ruhrgebiet in Nordrhein-Westfalen die Fälle akuten Leberversagens untersuchte (11), betrug der Anteil der medikamenteninduzierten akuten Leberversagen 39,6 Prozent, weitere Ursachen waren virale Hepatitiden (23,1 Prozent), heterogene Ursachen (16,4 Prozent) und in 20,9 Prozent konnte keine Ursache ermittelt werden. Insgesamt war das akute Leberversagen in 16,4 Prozent der Fälle durch Paracetamol induziert. Eine spontane Regeneration konnte in 66,4 Prozent festgestellt werden, während 33,6 Prozent nicht spontan regenerierten. Es erhielten 19,4 Prozent eine Lebertransplantation. 18,7 Prozent der gesamten Patienten verstarben.

Paracetamol (Acetaminophen) gehört zur Klasse nicht-sauren antipyretischen Analgetika. Die Eigenschaften sind denen der Acetylsalicylsäure ähnlich, beide wirken analgetisch und antipyretisch. Paracetamol wirkt dabei über eine Hemmung der Cyclooxygenase im zentralen Nervensystem (1). Paracetamol wird nach meist oraler Aufnahme vollständig in der Leber metabolisiert, indem Schwefelsäure- und Glucuronsäurekonjugate gebildet werden, die dann über die Niere ausgeschieden werden (1). Seine Toxizität entwickelt Paracetamol erst über einen Metaboliten, das N-Acetyl-p-benzochinonimin, der über ein Enzym des P450-Oxygenase-System (CYP2E1) gebildet wird (30; 20). Bei ausreichender Glutathionmenge in der Leber wird dieser Metabolit normalerweise eliminiert und als Mercaptursäurekonjugat über die Niere ausgeschieden. Im Falle, dass die Glutathionreserven erschöpft sind, vor allem also bei starker Überdosierung des Paracetamols, bindet das N-Acetyl-p-benzochinonimin kovalent an Proteine in den Leberzellen (1). Des Weiteren kommt es zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffgruppen und einer Störung des intrazellulären Calciumstoffwechsels. Daraus resultiert eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran und ein Absinken der Konzentration des Adenosin-tri-Phosphates, was zu einer Nekrose der Hepatozyten führt (24). Eine weitere Wirkung, die bei einer Überdosis von Paracetamol auftreten kann, ist eine Schädigung der Niere, insbesondere eine tubuläre Nekrose (23; 32; 44). Das typische morphologische Schädigungsmuster einer durch Paracetamol bedingten toxischen Hepatose ist eine zentrolobuläre Nekrose, die sich bei ausgeprägter Schädigung nach peripher ausbreitet (40).

1.3 Regeneration der Leber und Therapie des akuten Leberversagens

Die Leber zeigt im Fall einer toxischen Hepatose bestimmte Schädigungs- und Regenerationsmuster, für die das einwirkende Toxin nicht spezifisch ist. Bei den hepatotoxischen reaktiven Metaboliten, wie zum Beispiel den Metaboliten des Paracetamols, konzentriert sich die zytotoxische Reaktion zuerst auf das

Zentrum des Läppchens, das eine höhere Konzentration des P450-Enzymsystems und somit auch eine höhere Konzentration an zytotoxischen Metaboliten aufweist (24; 33).

Die Regeneration bei zentrolobulären Nekrosen, also auch bei Paracetamolintoxikationen, beginnt in den Bereichen des Läppchens um die Periportalfelder um sich anschließend über den intermediären Bereich des Läppchens in den zentralen Bereich auszubreiten (40). Auch bei sehr ausgeprägten Nekrosen finden sich noch intakte Hepatozyten im Bereich der Periportalfelder. Von dort beginnt die Regeneration durch Teilung der Hepatozyten. Bei Paracetamolintoxikationen ist bei ausreichender Überlebenszeit auch eine vollständige Regeneration des Lebergewebes zu erwarten (56).

In tierexperimentellen Studien wurde ein zusätzlicher Regenerationsmechanismus gezeigt (82). Bei Hemmung der Zellteilung der Hepatozyten durch N2-Acetylaminofluoren und Zufügung eines zentrolobulären Schadens durch Tetrachlorkohlenstoff fand die Regeneration der Leber über einen Stammzellpool, die ovalen Zellen, statt (82). Allerdings verlief diese Regeneration ohne Hemmung der Zellteilung in zwei Phasen, indem in den ersten 48 Stunden sich die vorhandenen Hepatozyten teilten und danach Zellen aus den Periportalfeldern in das Leberläppchen vorwuchsen und sich in Leberzellen differenzierten (75).

In weiteren Untersuchungen wurden Leberläppchen mittels eines Markers für Gallengänge, Cytokeratin 19, untersucht und eine Leber mit massiver Nekrose durch Paracetamolintoxikation mit gesunden Lebern verglichen. Hierbei stellte sich bei den gesunden Lebern heraus, dass über 90 Prozent der CK19-positiven Zellen in dem Bereich um das Periortalfeld in Verbindung standen und an mindestens einen Gallengang anschlossen. Bei der Leber mit der massiven Nekrose wurden deutlich mehr CK19 positive Zellen nachgewiesen, die ebenfalls größtenteils zusammenhingen. Dies ließ auf Vorläuferzellen mit Ursprung in den Gallengängen schließen, die in den Leberläppchen vorhanden sind und bei Leberzelluntergang stark zu proliferieren beginnen (69).

Zusammenfassend ist aber bei dem durch Paracetamol induzierten Leberversagen im Wesentlichen von der Regeneration in der Akutphase durch Teilung der noch vorhandenen periportalen Hepatozyten auszugehen (40; 56). Die Möglichkeit einer effektiven Therapie ist im akuten Leberversagen, zum Beispiel bei Paracetamolintoxikationen, entscheidend. Insbesondere hat es eine besondere Bedeutung, das Überleben im Leberversagen zu verlängern um möglicherweise eine spontane Regeneration ohne Lebertransplantation zu erreichen (56).

Bei einem durch Paracetamol induzierten Leberversagen stehen zuerst neben anamnestischen Angaben die Vitalparameter im Vordergrund, da ein akuter Ausfall der Leber zu einem Kreislaufschock führen kann. Im Labor sind die Parameter zu beachten, die einen Zerfall von Lebergewebe anzeigen wie zum Beispiel die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), aber auch Leberfunktionsparameter wie der Quickwert, der Albuminwert und der Ammoniakwert. Im weiteren Verlauf spielt dann die Ausprägung der hepatischen Enzephalopathie eine entscheidende prognostische Rolle. Zur Abschätzung des Verlaufs kann eine Leberbiopsie erwogen werden, um das quantitative Ausmaß der Lebernekrose abschätzen zu können. In Zusammenschau dieser Befunde müssen die Therapieoptionen bedacht werden, allen voran natürlich die Lebertransplantation (55).

Aktivkohle ist in der Akuttherapie eine der ersten Optionen um die Resorption noch im Darm befindlichen Paracetamols zu verhindern (8; 62). Ein weiterer wichtiger Therapieansatz ist die Gabe von N-Acetylcystein. In der frühen Therapie verhindert es, dass der Glutathionpool aufgebraucht wird und somit Paracetamol durch Metabolisierung seine toxische Wirkung komplett entfalten kann. Bei Paracetamolintoxikation bindet N-Acetylcystein über seine SH-Gruppe an das N-Acetyl-p-benzochinonimin ähnlich wie bei der Glutathionkonjugation und verhindert die Proteinbindung (1). Zudem hat N-Acetylcystein einen positiven Effekt auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel (61). Es gibt aber noch keine Evidenz, welches Therapieschema beim Einsatz des N-Acetylcysteins zu bevorzugen ist (8). Der positive Effekt auf das Überleben ist deutlich, allerdings sollte bei

fortgeschrittener Enzephalopathie eine Lebertransplantation durchgeführt werden, da hier das N-Acetylcystein keinen positiven Effekt mehr hat (42). Einen positiven Effekt zeigt das N-Acetylcystein einigen Studien gemäß auch, wenn es mehr als zehn Stunden nach Einnahme der Überdosis von Paracetamol verabreicht wurde (21; 58). Bei zeitlich ausgedehnter Gabe des N-Acetylcysteins wurde von YANG et al. tierexperimentell eine verschlechterte Regeneration der Leber beschrieben als bei kürzerer Anwendung (81).

Eine weitere Möglichkeit der Therapie in der Akutphase sind Leberunterstützungsverfahren. Die Möglichkeiten reichen von der temporären Transplantation einer Fremdleber bis zur Regeneration der eigenen Leber des Patienten, über Bioreaktoren mit Hepatozyten bis hin zu Verfahren zu den Leberdialyseverfahren wie zum Beispiel das Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS). Im klinischen Alltag ist das MARS-System das am häufigsten angewandte Leberersatzverfahren (79).

Das MARS wird in mehreren Studien als effizient in der Therapie des akuten Leberversagens beschrieben. Es kam häufig bei Patienten mit akutem Leberversagen zum Einsatz, die noch auf ein Spenderorgan warteten. In diesem Zusammenhang zeigte sich in einigen Studien auch ein Vorteil in der spontanen Regeneration unter MARS-Therapie, da bei mehr Patienten als erwartet die Leber wieder ihre Funktion aufnahm (10; 50; 51). Das MARS bedient sich als Grundlage der Filtration an Albumin gebundener Toxine mittels eines Parallelkreislaufs, der durch eine spezielle Membran vom Blut getrennt ist und als semipermeable Membran nur den Durchtritt bestimmter Substanzen erlaubt. Das in diesem zirkulierende Albumin wird mittels zweier Filter von den gebundenen Toxinen gereinigt. Mittels der Beschaffenheit der Poren in der Membran zwischen Blutkreislauf und Albuminkreislauf kann der Übertritt bestimmter Giftstoffe, aber auch von Zytokinen in den Albuminkreislauf reguliert werden (47). Das MARS ermöglicht zusätzlich eine Regulation des Flüssigkeitshaushalts, so dass bei entsprechendem Bedarf mehr Flüssigkeit abfiltriert werden kann (65; 74).

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es die histologischen Veränderungen und die Regeneration, die mittels Immunhistochemie ermittelt wurde, im zeitlichen Verlauf darzustellen und mit der Überlebensdauer der Tiere im akuten paracetamolinduzierten Leberversagen in Bezug zu setzen. Hierbei werden die in der Tierstudie eingesetzten MARS-Therapien untereinander und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die histologische Auswertung wird nach den Kriterien der Ausdehnung der Nekrose, der Menge der infiltrierenden Leukozyten und der immunhistochemisch bestimmten Proliferationsrate durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die im Folgenden zur Durchführung der Tierversuche aufgeführten Materialien finden alle auch Verwendung in der Humanmedizin.

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit weiblichen Schweinen der deutschen Landrasse durchgeführt. Das mittlere Gewicht der Tiere betrug 34 ± 5 kg. Die Versuche wurden vom zuständigen Regierungspräsidium genehmigt.

2.1.2 Technische Geräte

Zur Beatmung, Überwachung, Blutgasanalyse und Operation wurden folgende Geräte eingesetzt:

Gerät	Handelsname	Firma
Beatmungsgerät	Kion SC 9000XL	Siemens

Gerät	Handelsname	Firma
Überwachungsmonitor	IntelliVue MP50 Anesthesia	Philips
Blutgasanalysegerät	ABL 800 Flex	Radiometer
Elektrokauter	Erbotom 400 C	Erbe

Tabelle 1: Technische Geräte

2.1.3 Sonden und Katheter

Zum invasiven Monitoring, zur Infusionsgabe, zur Paracetamolgabe und zum Harnableiten wurden folgende Materialien eingesetzt:

Material	Produktname	Firma
Arterieller Katheter	Leader-Cath®; 4,5 Fr/1,5mm; 25 c	VYGON
Shaldon-Katheter	Blue Flex Tip®	Arrow int.
Blasen Katheter	Absaugkatheter 14CH	Tyco Healthcare
Darmkatheter	Absaugkatheter 14CH	Tyco Healthcare
Magensonde	Kendall Argyle™, Saugerschlauch	Tyco Healthcare
Temperatursonde	IntelliVue	Philips

Tabelle 2: Sonden und Katheter

2.1.4 Medikamente

Zur Anästhesie und Therapie wurden folgende Medikamente eingesetzt:

Wirkstoff	Handelsname	Firma
Atropinsulfat 0,5 mg/ml		Köhler Chemie
Azaperon 4%	Stresnil®	Janssen

Wirkstoff	Handelsname	Firma
Calciumchlorid 5,5%	Calciumchlorid 5,5 % Baxter	Baxter
Ceftriaxon 2 g	Ceftriaxon-Hexal®	Hexal
Erythrozytenkonzentrat 300 ml		
Fentanylcitrat 50 µg/ml	Fentanyl-Ratiopharm®	Ratiopharm
Fresh frozen plasma 300 ml		
Furosemid-Natrium, 10 mg/ml	Lasix®	Aventis
Glukose-Monohydrat 20%	G20 Glukosteril®	Fresenius Kabi
Heparin-Natrium 10000 I.E./ml	Heparin-Natrium Braun „Multi“	B. Braun
HydroxyethylstärkeLösung 6% 500 ml	Voluven®	Fresenius Kabi
Kaliumchlorid-Lösung 1 M	1 M-Kaliumchlorid- Lösung Baxter	Baxter
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ursotamin®	Serumwerk Bernburg
Magnesiumbishydrogen-l- Glutamat	Magnesium Verla®	Verla
Midazolam-Hydrochlorid 5 mg/ml	Midazolam- Ratiopharm®	Ratiopharm
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Natrium-Chlorid Lösung 0,9%	Fresenius Kabi
Natriumhydrogencarbonat 8,4%	NaBic®	B.Braun
Norepinephrin 1mg/ml	Arterenol®	Sanofi Aventis
Paracetamol 500 mg Tabletten	Paracetamol- ratiopharm®	Ratiopharm
Propofol 1%	Propofol-Fresenius	Fresenius Kabi

Tabelle 3: Medikamente für Anästhesie und Therapie

2.1.5 MARS-Systeme

Für die Versuche wurden drei verschiedene Varianten des MARS-Systems (Variante 1, 2 und 3) verwendet. Bei der Variante 3 erfolgt die Filtration auf Liposomen basiert. Die weiteren Unterschiede können hier aus patentrechtlichen Gründen nicht aufgeführt werden.

Für die Behandlung mit dem MARS wurden folgende Komponenten verwendet:

Material	Handelsname	Firma
Dialysatlösung	Haemosol/BO	Hospal
Extrakorporale Blutpumpe	Prisma CFM	Hospal
Glucose-Monohydrat 5%	G5 Glucosteril®	Fresenius Kabi
MARS®-Monitor		Gambro
MARS®-Behandlungsset		Gambro
N-Acetylcystein 20%	Fluimucil®	Zambon

Tabelle 4: Geräte und Lösungen für die MARS-Therapie

2.1.6 Histologie und Immunhistochemie der Leberbiopsien

Für die HE-Färbung und die immunhistochemischen Reaktionen wurden folgende Materialien, die in der Tabelle dargestellt sind, verwendet.

Reagenz	Firma
monoklonal mouse anti human Ki-67 Antigen Clone MIB-1	Dako, Hamburg
Xylol	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Ethanol	MERCK, Darmstadt
PBS	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
10 mM Citrat Puffer	MERCK, Darmstadt

Reagenz	Firma
rabbit serum R9133	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
BSA (Bovine serum albumin)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
TBS (Tris-buffered saline)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Antikörper rabbit anti mouse Ig Z0259	Dako, Hamburg
New Fuchsin K0698	Dako, Hamburg
Mayer´s Hämalun	MERCK, Darmstadt
Kaiser´s Glycingelatine	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Eosin	Merck, Darmstadt
APAAP mouse monoclonal D0651 Antikörper	Dako, Hamburg

Tabelle 5: Reagenzien und Antikörper für die Aufbereitung der Leberbiopsien

2.1.7 Computerprogramme

Statistik und Diagramme: Jump 6.0 von SAS Institute und GraphPad Prism 5 von GraphPad Software.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell

Die Durchführung war auf Antrag von der zuständigen Stelle des Regierungspräsidium Tübingen genehmigt worden. Die Tierschutzbestimmungen wurden zu jeder Zeit im Umgang mit den Tieren eingehalten.

2.2.1.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung des Versuchs wurden die Tiere nüchtern gehalten. Eine Prämedikation der Tiere erfolgte anschließend mit Atropinsulfat (0,05 mg/ kg KG i.m.) und Azaperon (3 mg/kg KG i.m.). Es wurde ein peripherer Venen-

katheter in eine Ohrvene gelegt und durch diesen Propofol (1 - 1,3 mg/kg KG i.v.) gegeben. Im Anschluss wurden bei ausreichender Sedierung des Tieres die orotracheale Intubation und das Einlegen einer Magensonde durch einen Veterinärmediziner durchgeführt. Die Tiere wurden auf einem Tisch auf dem Rücken gelagert. In dem Tisch war eine Aussparung für die Ohren der Tiere. Sedierte wurden die Tiere abhängig vom Körpergewicht mit Ketamin (15 mg/kg/h), Midazolam (0.9 mg/kg/h) und Fentanyl (0.02 mg/kg/h) jeweils über einen Perfusor. Beatmet wurden die Tiere maschinell druckkontrolliert mit einem Luft/Sauerstoffgemisch mit einem Tidalvolumen von 6-12 ml/kg und einer Frequenz von 8 - 15 Zügen pro Minute.

Nach Präparation der Arteria carotis interna auf einer Seite wurde ein arterieller Katheter eingelegt und mittels Druckmodul eine arterielle Blutdruckmessung durchgeführt. In die Venae jugulares externae beiderseits wurden nach Präparation jeweils dreilumige Shaldonkatheter eingebracht und auf einer Seite ein Druckmodul zur Bestimmung des zentralvenösen Druckes angebracht. Die Zufuhr von Narkotika und Infusionen sowie die Dialyse erfolgten über die Shaldonkatheter.

Es erfolgte eine mediane Laparotomie worüber ein Blasenkatheter in die Harnblase und eine Applikationssonde für das Paracetamol in das proximale Jejunum eingebracht wurden.

2.2.1.2 Induktion des Leberversagens

Nach Abschluss der Vorbereitungen wurde den Tieren ein Bolus von 0,25 g pro Kilogramm Körpergewicht Paracetamol in 50 ml Wasser über die Jejunalsonde gegeben. Die Erhaltungsdosis betrug 2 g/h in 10 ml Wasser gelöst. Alle vier Stunden erfolgte eine Bestimmung des Plasmaspiegels des Paracetamols durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen. Die angestrebte Plasmakonzentration betrug 300 mg bis 450 mg/l. Bei Über- oder Unterschreiten der Plasmakonzentration konnte die stündliche Erhaltungsdosis variiert werden. Das definierte Leberversagen war bei einem INR-Wert (International Normalized Ratio) > 1,5 erreicht und die Paracetamolgaben wurden gestoppt.

2.2.1.3 Intensivmedizinische Überwachung

Zur Überwachung wurden ein Elektrokardiogramm (EKG), der arterielle Mitteldruck (MAP), der zentralvenöse Druck (ZVD) und die Beatmungsparameter, die am Beatmungsgerät abgelesen werden konnten, herangezogen. Zur Bilanzierung wurden Ein- und Ausfuhr dokumentiert. Die Messung der Temperatur erfolgte durch eine rektale Sonde. Die Sauerstoffsättigung (SpO₂) wurde am Schwanz des Tieres gemessen. Von der Beatmung wurden der inspiratorische Spitzendruck (PIP), der positive endexpiratorische Druck (PEEP), der Gehalt an Kohlendioxid der Atemluft und die Sauerstoffkonzentration der Beatmungsluft (FiO₂) dokumentiert. Stündlich und bei Bedarf wurde eine Blutgasanalyse aus arteriellem Blut durchgeführt.

Die Therapie erfolgte angepasst an die einzelnen Überwachungsparameter. Blut wurde vor der ersten Paracetamolgabe sowie anschließend alle acht Stunden entnommen und zur Diagnostik in das Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen verschickt. Dort erfolgte eine Bestimmung der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokritwertes, der Erythrozytenzahl, der Leukozytenzahl, der Thrombozytenkonzentration, des Gesamteiweiß, des Albumins, des Gesamtbilirubins, des Bilirubins direkt, der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), der Laktatdehydrogenase (LDH), der alkalischen Phosphatase (AP), der Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), des Kreatinins, des Harnstoffs und des Ammoniakspiegels. Die Gerinnungsparameter (INR, partielle Thromboplastinzeit) und der Paracetamolspiegel wurden alle vier Stunden bestimmt.

2.2.1.4 Intensivmedizinische Therapie

Volumentherapie erfolgte auf die individuelle Situation angepasst mit 0,9 % NaCl-Lösung, 6% HydroxyäthylstärkeLösung und bei einem Hämoglobin-Abfall unter 6 g/dl wurden Erythrozytenkonzentrate aus Schweineblut transfundiert. Zur Aufrechterhaltung des arteriellen Mitteldrucks bei einem Wert von 50 bis 70 mmHg wurde nach Bedarf Norepinephrin über einen Perfusor gegeben. Metabolische Azidosen wurden mittels 8,4% Natrium-Bicarbonat ausgeglichen.

Alle 24 Stunden wurden zwei Gramm Ceftriaxon zur Sepsisprophylaxe intravenös gegeben.

2.2.1.5 Gewinnung der Gewebeproben

Alle 24 Stunden wurde der Bauchraum durch die mediane Laparotomie eröffnet und ein Keil der Grösse 10x10x5 mm aus dem Rand der Leber geschnitten. Der Schnitttrand an der Leber wurde elektrisch koaguliert und die Bauchhöhle verschlossen. Das gewonnene Lebergewebe wurde in Formaldehydlösung mit einer Konzentration von 4 % fixiert.

2.2.1.6 Therapiegruppen und MARS-Therapie

Insgesamt wurden 28 Tiere in vier Gruppen mit jeweils sieben Tieren durch Blockrandomisierung eingeteilt. Bis zum Eintritt des definierten Leberversagens erfuhren alle Tiere die gleiche intensivmedizinische Therapie. Erst bei Eintritt des Leberversagens wurde die Zugehörigkeit zu einer Therapiegruppe bekannt gegeben, anschließend unterschieden sich die therapeutischen Maßnahmen.

Kontrollgruppe: Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten nach Eintritt des Leberversagens Fresh Frozen Plasma (FFP) nach Bedarf, die weitere intensivmedizinische Therapie wurde individuell angepasst weitergeführt.

Bei Variante 1 und Variante 2 wurden direkt nach Eintritt des Leberversagens drei FFP innerhalb von zwei Stunden infundiert, anschließend begann die jeweilige MARS-Therapie, die über sechs Stunden ging.

Bei Variante 3 erhielten die Tiere bei Eintritt des Leberversagens ebenfalls drei FFP, zeitgleich begann eine dreiphasige Therapie mit dem Paracetamolantidot N-Acetylcystein. In der ersten Phase wurden 150 mg/kg KG in 200 ml G5-Glukoselösung innerhalb von 15 Minuten gegeben. Die zweite Phase bestand aus einer Gabe von 50 mg/kg KG in 500 ml G5 über 4 Stunden. In den darauf folgenden 16 Stunden wurde 100 mg/kg KG in 1000 ml G5-Glukoselösung gegeben. Parallel zur N-Acetylcysteingabe in Phase drei wurde die Therapie mit der MARS-Variante 3 durchgeführt.

Die Flussraten des Blutes bei der Dialysebehandlung betragen 55 bis 100 ml/min, die Flussrate des Dialysats betrug 250 ml/min. Ein erneuter Zyklus der

MARS-Therapie wurde bei entsprechender Überlebenszeit 24 Stunden nach Beginn des ersten Zyklus durchgeführt.

2.2.2 Aufbereitung der Leberbiopsien

Das Ki-67-Protein ist ein Protein, das während der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus im Zellkern vorhanden ist und immunhistochemisch nachgewiesen werden kann, als Zeichen das sich die Zelle in der Proliferation befindet. In nicht proliferierenden Zellen in der G0-Phase ist das Protein nicht nachweisbar (63).

Für die immunhistochemische Reaktion für das Ki-67 Antigen wurden die Schnitte zum entparaffinieren dreimal für fünf Minuten in Xylol und anschließend zweimal für fünf Minuten in einhundertprozentigem Alkohol getaucht. Danach wurden die Schnitte für jeweils drei Minuten in 96-prozentigen und 70-prozentigen Alkohol getaucht um zuletzt fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen zu werden.

Als nächster Schritte folgte die Antigendemaskierung, wofür die Objektträger für 20 Minuten bei 95 bis 100 Grad Celsius in einem mit 10 mM Citratpuffer vorgeheizten Dampfkochtopf inkubiert wurden. Nachdem die Objektträger anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie noch mit Phosphate Buffered Saline (PBS) zweimal für jeweils drei Minuten gewaschen. Zur weiteren Behandlung wurden die Schnitte mit PBS-Puffer, der mit 1,5 Prozent Rabbit Serum und einem Prozent Bovine Serum Albumin (BSA) versetzt war, für 30 Minuten nachbehandelt und die Lösung anschließend abgekippt. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper gegen Ki-67 (Monoklonal mouse anti human Ki-67 Antigen Clone MIB-1, Firma Dako Hamburg) der für 24 Stunden mit einer Verdünnung von 1 zu 20 bei 4 Grad Celsius einwirkte. Nach 24 Stunden erfolgte eine Spülung mit Tris-Buffered Saline (TBS) für drei mal fünf Minuten. Die weiteren Schritte waren die Behandlung der Objektträger mit Antikörper Ig Z0259 als Sekundärantikörper für 30 Minuten und nach dreimaligem Spülen mit TBS erfolgte die Behandlung mit dem Tertiärantikörper-Kit (APAAP mouse monoclonal D0651 Antikörper), 1

zu 50 in TBS mit einem Prozent BSA verdünnt, für 35 Minuten und erneut dreimaligem Spülen mit TBS für je fünf Minuten. Die Antikörperreaktion wurde mit Neufuchsin sichtbar gemacht, sodass eine positive Reaktion gegen das Ki-67-Antigen rot erscheint. Hierfür mussten die Schnitte für 35 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur in der Neufuchsin-Lösung (Substrat Dako New Fuchsin K 0698) inkubiert werden. Anschließend erfolgte erneutes dreimaliges Waschen mit TBS für je fünf Minuten. Gegengefärbt wurden die Schnitte mit Mayer's Hämalaun, das 1 zu 10 in TBS verdünnt wurde, für zehn Minuten. Zuletzt erfolgte ein Waschen der Schnitte mit Leitungswasser für zwei mal zwei Minuten und Eindeckeln mit einem Deckglas mit Kaiser's Glyceringelatine.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und in eine Hämalaun-Lösung für sechs Minuten für die Kernfärbung gestellt und danach für zehn Minuten in Leitungswasser zum Bläuen gespült und dann mit Aqua destillata gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung in einer Eosinlösung (0,1% in Aqua destillata) für zehn Minuten und ein erneutes Auswaschen mit Leitungswasser für fünf Minuten. Danach erfolgte ein erneutes Entwässern durch kurzes Eintauchen der Schnittpräparate in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und in Xylol für drei Minuten. Zuletzt wurden die Schnitte mit Kaiser's Glycerolgelatine und einem Deckglas eingedeckelt.

2.2.3 Auswertung der Leberbiopsien

Die Auswertung erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Es wurden zur Auswertung Läppchen ausgewählt, die unter zweihundertfacher Vergrößerung ein Gesichtsfeld mit ihrer Größe nicht überschritten was einer Größe von ungefähr 800-1000 Mikrometern entspricht, aber auch nicht deutlich unterschritten, da hierdurch eine Vergleichbarkeit der Läppchen bezüglich der Zoneneinteilung gegeben ist, was bei unterschiedlicher Größe der Läppchen nicht gegeben wäre. Die Läppchen wurden in drei Zonen geteilt, eine äußere Zone (Zone I), eine intermediäre (Zone II) und eine zentrale (Zone III). Die innere Zone befand sich direkt um die Zentralvene, die beiden anderen Zonen

schlossen sich nach außen hin an. Zur Einteilung der Zonen wurde der Abstand der Zentralvene zum Lappchenrand in drei gleich große Abschnitte in jede Richtung geteilt, wie man in der folgenden Abbildung 2 sehen kann.

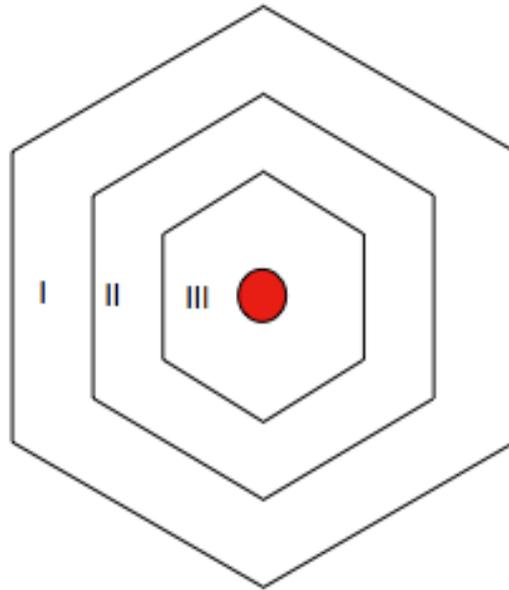
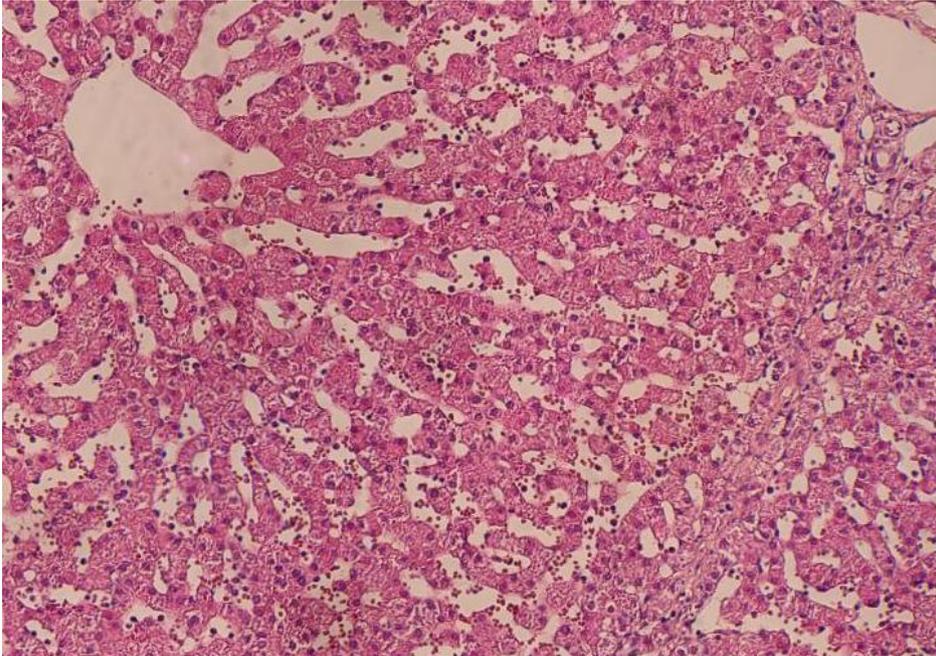


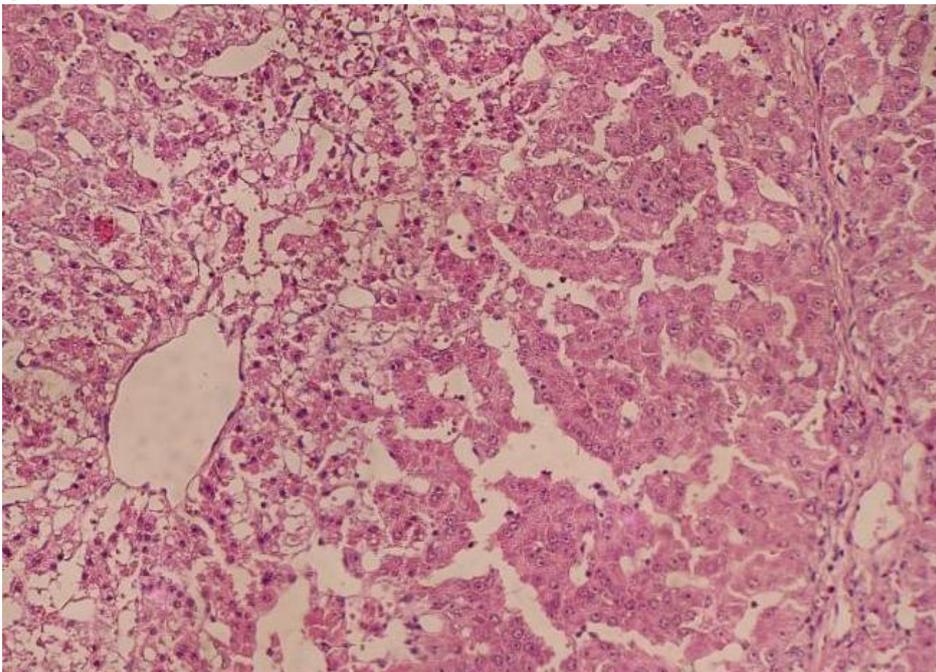
Abbildung 2: Schematische Abbildung eines Leberlappchens mit Darstellung der Zonen I, II und III. Die Zentralvene wird durch den roten Kreis dargestellt.

Die Ausdehnung der Nekrose wurde nach dem vorherrschenden Zustand des Lappchens in der jeweiligen Zone beurteilt. Aufgrund der Ausdehnung der Nekrose von innen nach außen wurde einer Nekrose in der zentralen Zone III der Buchstabe b zugeordnet, einer Nekrose in den beiden inneren Zonen der Buchstabe c und einer Nekrose in allen Zonen der Buchstabe d. Lappchen ohne Nekrose wurden mit dem Buchstaben a bezeichnet (Abbildung 3). Zur statistischen Auswertung wurde a die Zahl 0, b die Zahl 1, c die Zahl 2 und d die Zahl 3 zugeordnet.

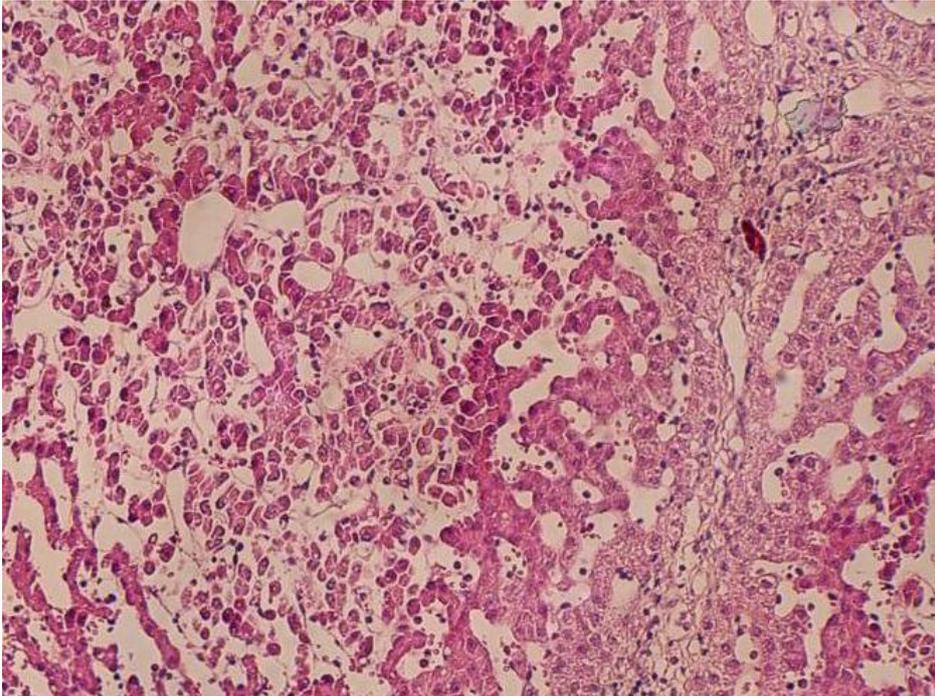
Stadium a – keine Nekrose



Stadium b – nur zentrale Nekrose



Stadium c – Nekrose der beiden inneren Zonen



Stadium d - Nekrose in allen drei Zonen

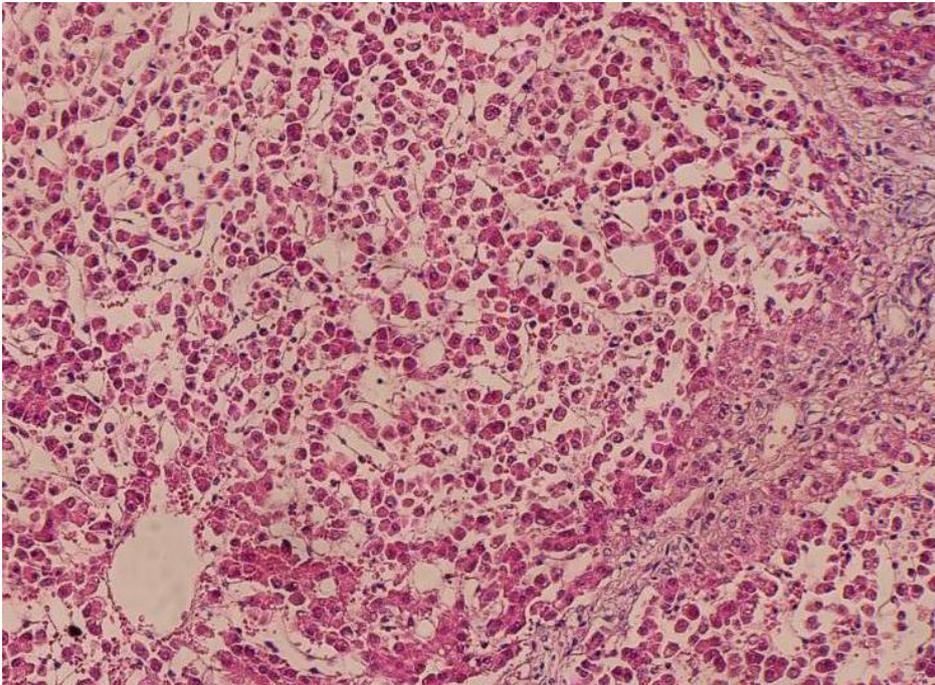


Abbildung 3: Bewertung der Nekrose nach Ausmaß: Stadium a: keine Nekrose; Stadium b: nur zentrale Nekrose; Stadium c: Nekrose der beiden inneren Zonen; Stadium d: Nekrose in allen drei Zonen (HE 200 fache Vergrößerung, Bildausschnitte).

Die Auszählung KI-67-positiver Zellen erfolgte ebenfalls anhand der Zonen-einteilung. So konnten die Läppchen nach der jeweiligen Zone und der Gesamtsumme des Läppchens ausgewertet werden. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, stellen sich die Ki-67-positiven Zellkerne rot dar. Es wurden nur Zellen gezählt, die morphologisch sicher Hepatozyten sind. Es wurde ein Proliferationsindex aus den positiven Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der Zellen in der Zone gebildet und anschließend als Prozentwert angegeben. Es wurden pro Biopsie fünf Läppchen ausgewertet.

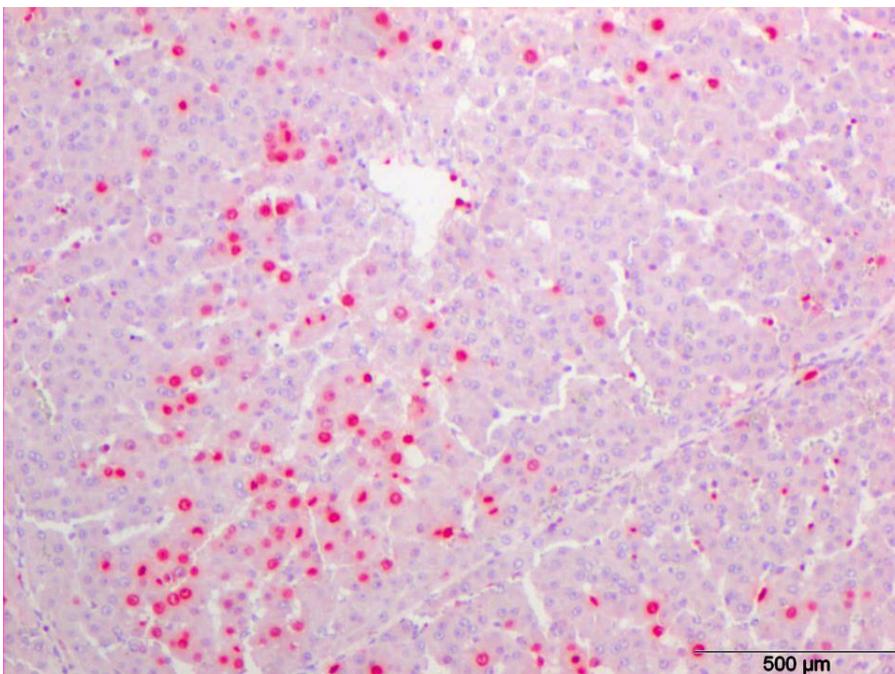


Abbildung 4: Ki-67-positive Zellkerne (rot) in einem Leberläppchen (Immunhistochemische Reaktion für Ki-67, 200fache Vergrößerung)

Leukozyteninfiltrate: Die Einteilung der Leukozyten die in den Leberläppchen vorhanden sind, insbesondere in den Sinusoiden erfolgte mittels einer semiquantitativen Abschätzung so entspricht der Buchstabe x einer mittleren Anzahl an Leukozyten, die Kennzeichnung 0 für deutlich verminderte Anzahl und die Kennzeichnung xx für eine vermehrte Leukozytenzahl in den Läppchen einschließlich der Sinusoide. Zur statistischen Auswertung wurde x die Zahl 1, xx die Zahl 2 und 0 entsprechend die Zahl 0 zugeordnet.

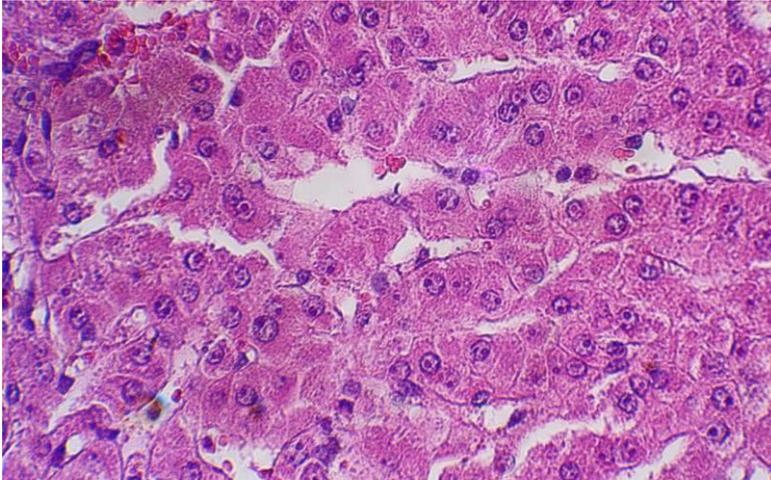
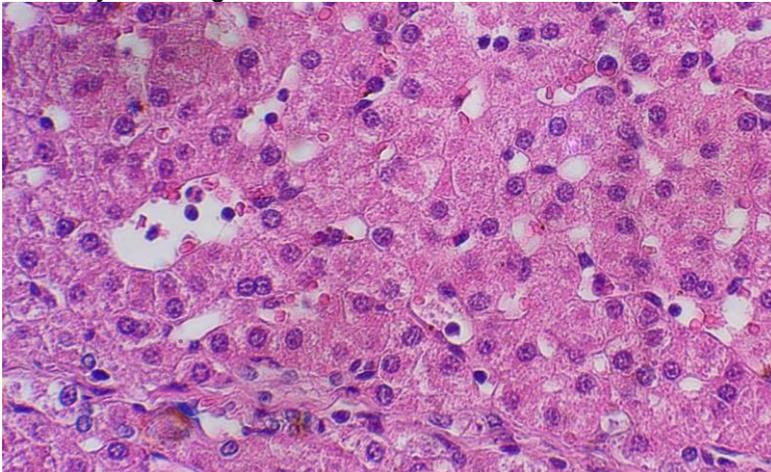
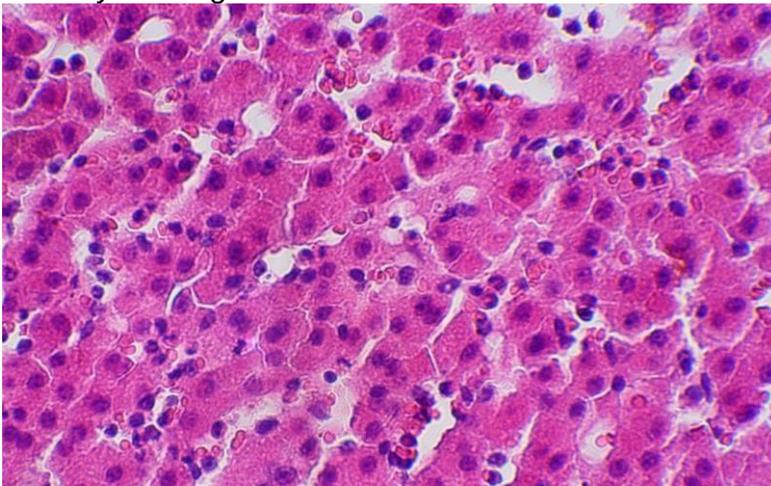
Leukozytenmenge 0*Leukozytenmenge X**Leukozytenmenge XX*

Abbildung 5: Bewertung der Leukozytenmenge: Wertung 0: Vereinzelte oder gar keine Leukozyten; Wertung X: Mittlere Anzahl an Leukozyten; Wertung XX: Deutlich vermehrt Leukozyten feststellbar (200 fache Vergrößerung, Bildausschnitte)

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der multiplen Gruppen erfolgte mittels dem nicht-parametrischen und Bonferoni-adjustierten Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test in Jump 6.0, das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Damit konnte statistisch gezeigt werden, ob alle Proben derselben Grundgesamtheit entstammen, ein paarweiser Mittelwertvergleich konnte bei fehlendem Nachweis einer Normalverteilung bei kleiner Fallzahl nicht durchgeführt werden.

Die Analyse der Dauer des Leberversagens erfolgte nach Kaplan-Meier und wurde mittels eines Log-Rang-Tests statistisch.

Die Grafiken wurden mittels Jump 6.0 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Überlebenszeiten im Leberversagen

Die unten abgebildete Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abbildung 6) zeigt die vier Vergleichsgruppen.

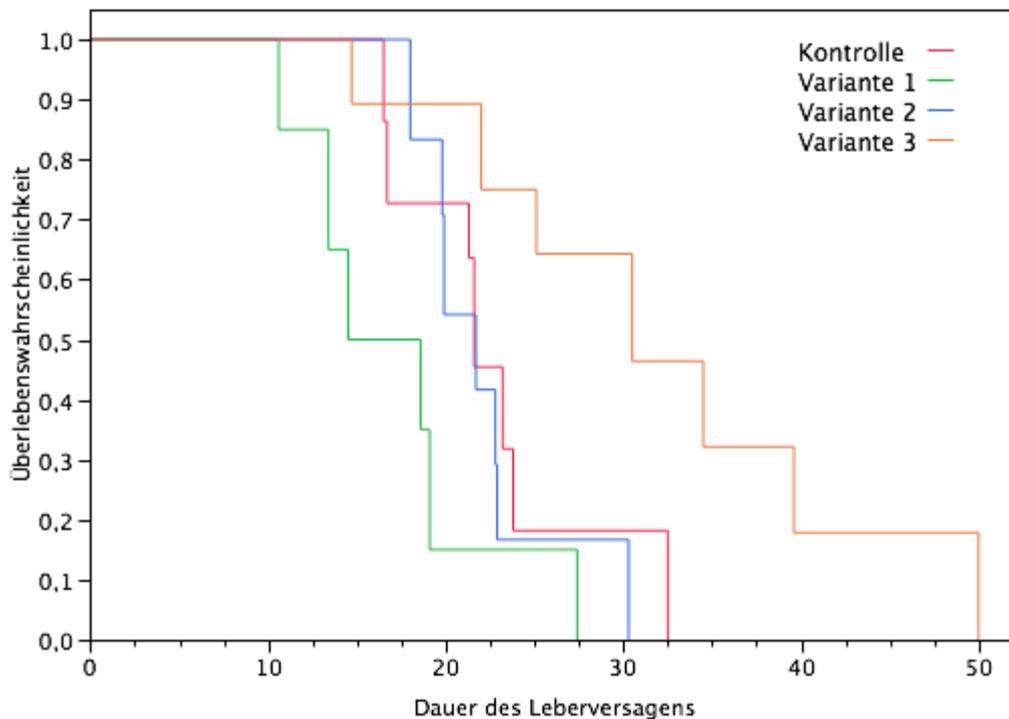


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Diagramm der Dauer des Leberversagens nach Therapiegruppen

Die Überlebenszeit bei Variante 1 war mit einer mittleren Überlebenszeit im Leberversagen von 17,2 ($\pm 5,2$) Stunden deutlich kürzer als die Überlebenszeit in den anderen Gruppen.

Die Variante 2 lag mit 22,3 ($\pm 4,0$) Stunden Überlebenszeit im Leberversagen in einem ähnlichen Zeitrahmen mit der Kontrollgruppe mit 22,7 ($\pm 5,3$) Stunden. Die längste mittlere Überlebenszeit gab es bei Variante 3. Diese betrug 32,4 ($\pm 10,9$) Stunden.

Der Log-Rang-Test ergab ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,0001$).

3.2 Auswertung der Nekrose:

Die Nekrose beginnt bei einer Paracetamolintoxikation zentrolobulär, also in dem Bereich um die Zentralvene, und setzt sich nach außen hin fort. In den histologischen Präparaten konnte dieser Verlauf ebenfalls beobachtet werden. Die Auswertung zeigte, wie im Verlauf die Ausdehnung nekrotischer Areale zunahm und bei Exitus die meisten Läppchen komplett oder zum größeren Teil nekrotisch waren (Abbildung 7).

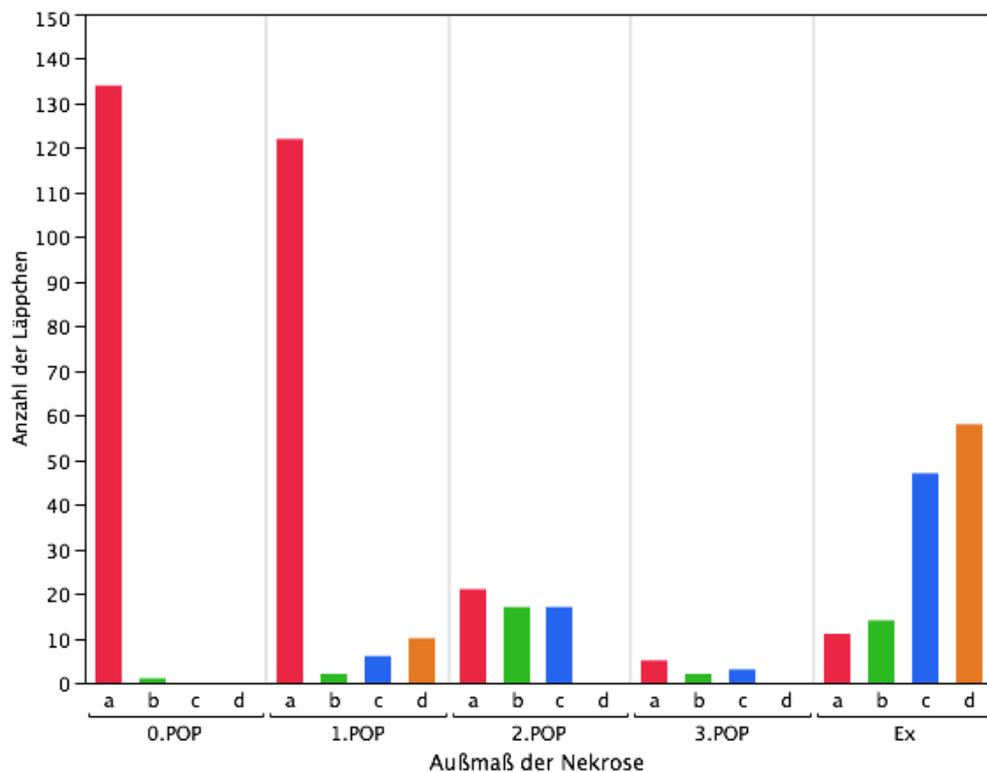


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Ausbreitung der Nekrose (a: ohne Nekrose b: nur zentrale Nekrose c: Nekrose zentral und intermediär d: vollständige Läppchennekrose)

Man sah im zeitlichen Verlauf der Nekroseausdehnung (Abbildung 7) am ersten Tag nach Vergiftung bereits komplett nekrotische Läppchen entsprechend der Kategorie d (10 von 140 Läppchen), der größte Teil der Leberläppchen wies jedoch keine nekrotischen Areale entsprechend Kategorie a (122 von 140) auf. 48 Stunden nach Vergiftung hatte die Zahl der

nekrotischen Läppchen (34/55) deutlich zugenommen, wobei jedoch keine komplett nekrotischen Läppchen mehr zu finden waren. Nach 72 Stunden lebten nur noch zwei Tiere bei Variante 3, sodass dieser Wert in der Auswertung außer Acht gelassen wurde. Bei Exitus fanden sich im überwiegenden Teil der ausgewerteten Läppchen Nekrosen, davon wiesen wiederum der große Teil der Läppchen ausgeprägte (Kategorie c) (47/130) oder totale Nekrosen (Kategorie d) (58/130) auf.

Die Abbildung 8 zeigt den weiteren zeitlichen Verlauf der mittleren Nekroseausbreitung, hier sieht man, dass die größte Ausdehnung der Nekrose bei Exitus zu finden ist. Der Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test ergab ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,0001$).

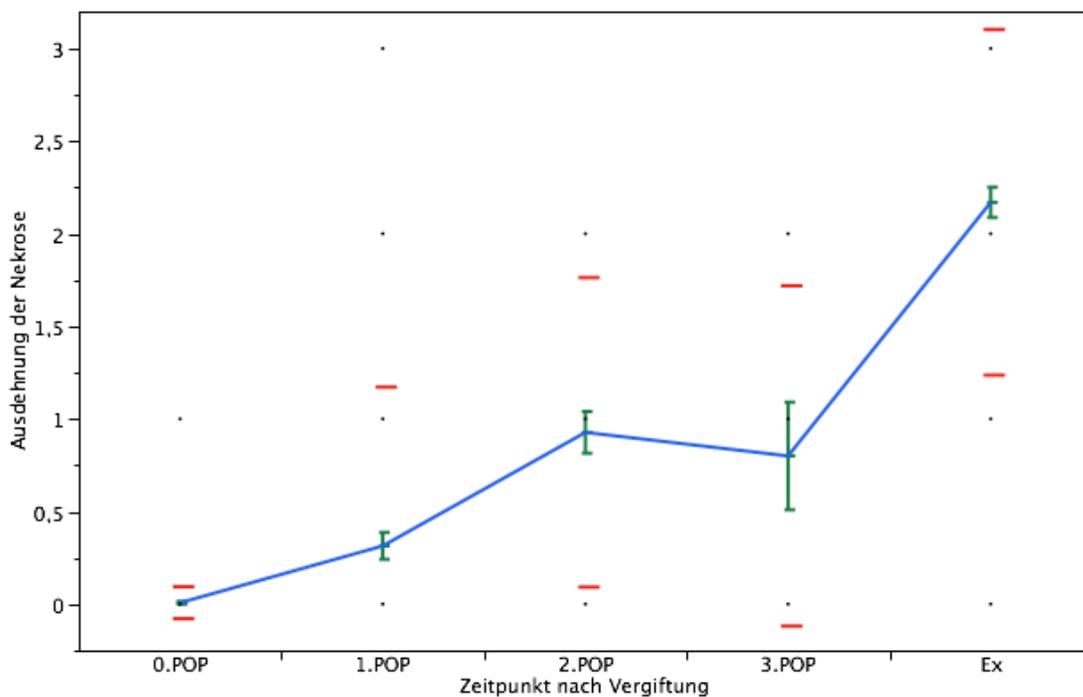


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Nekroseausdehnung (0: keine Nekrose; 1: nur zentrale Nekrose; 2: Nekrose der beiden inneren Zonen; 3: vollständige Läppchennekrose; rote Linien: Standardabweichung; grüne Linien: Standardfehler)

3.2.1 Vergleich der Nekrose unter MARS-Therapie

Nach 48 Stunden sah man einen signifikanten Unterschied (Wilcoxon –Kruskal-Wallis-Test $p < 0,0001$). Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, zeigte sich der deutlichste Unterschied zwischen einerseits der Kontrollgruppe und Variante 3 und andererseits Variante 1 und 2. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich bei Variante 1 in allen fünf betrachteten Leberläppchen eine Nekrose in den beiden inneren Zonen (Kategorie c). Die Variante 2 hatte ebenfalls in allen Läppchen Nekrose, in dieser Gruppe hatten fünf Läppchen eine zentrale Nekrose (Kategorie b), zehn Läppchen zeigten eine Nekrose in den inneren beiden Zonen (Kategorie c). Bei Variante 3 zeigten sich keine Läppchen mit ausgedehnter Nekrose, es fanden sich aber Läppchen mit nur zentraler Nekrose (Kategorie b) (11/25) oder Läppchen ohne Nekrose (Kategorie a) (14/25). Die Kontrollgruppe hatte nach 48 Stunden anteilig die größte Anzahl an Läppchen ohne Nekrose (a) (7/10).

Auffällig war hier wieder die deutlich ausgedehntere Nekrose bei Variante 1 und 2 gegenüber der Variante 3 und der Kontroll-Gruppe.

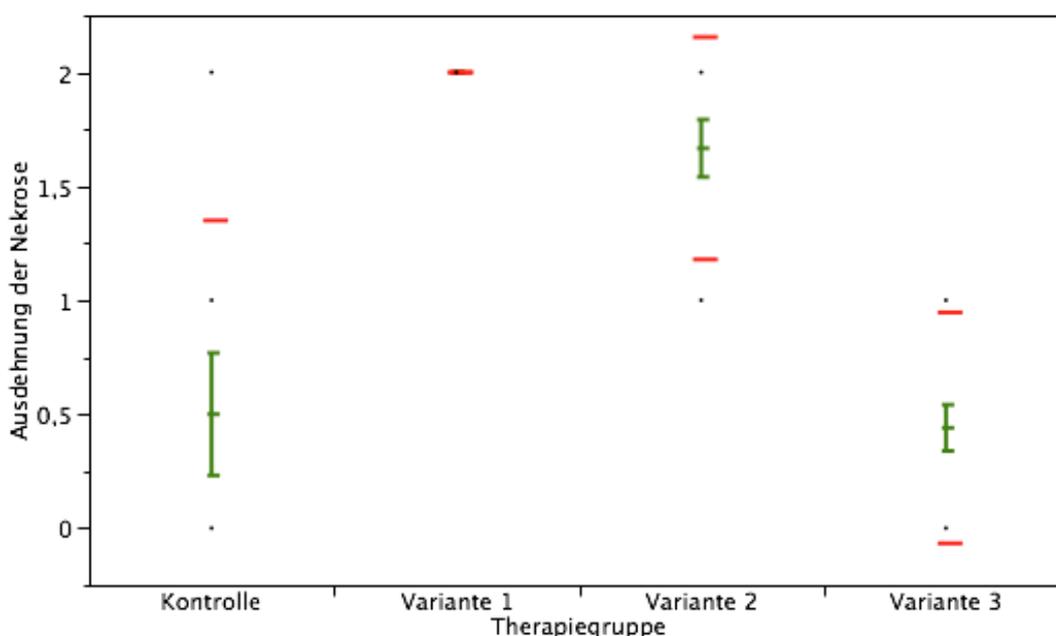


Abbildung 9: Ausmaß der Gesamtnekrose nach 48 Stunden nach Vergiftung in den unterschiedlichen Therapiegruppen (rote Linien: Standardabweichung; grüne Linien: Standardfehler)

Bei Exitus (Abbildung 10) fand sich eine andere Verteilung als nach 48 Stunden. Hier waren bezüglich wenig (Kategorie b) oder gar nicht betroffener (Kategorie a) Läppchen die Kontroll-Gruppe und die Variante 3 wiederum besser als die Variante 1 und 2 (8/35 bzw. 3/35 gegenüber jeweils 0/30 der Kategorie a). Die Anteile komplett nekrotischer Läppchen (Kategorie d) waren jedoch geringer bei Variante 1 (10/30) und Variante 2 (10/30) als bei Variante 3 (18/35) und der Kontrollgruppe (20/35). Der Anteil wenig nekrotischer, also nur in der zentralen Zone III (b), oder gar nicht nekrotischer Läppchen (a) war bei Variante 3 und der Kontroll-Gruppe aber deutlich höher als in den beiden anderen Gruppen, wobei dieser Anteil bei Variante 3 der höchste war. Das Ausmaß der Nekrose unterschied sich zwischen den Gruppen bei Exitus nicht hier nicht signifikant (Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test $p = 0,5$).

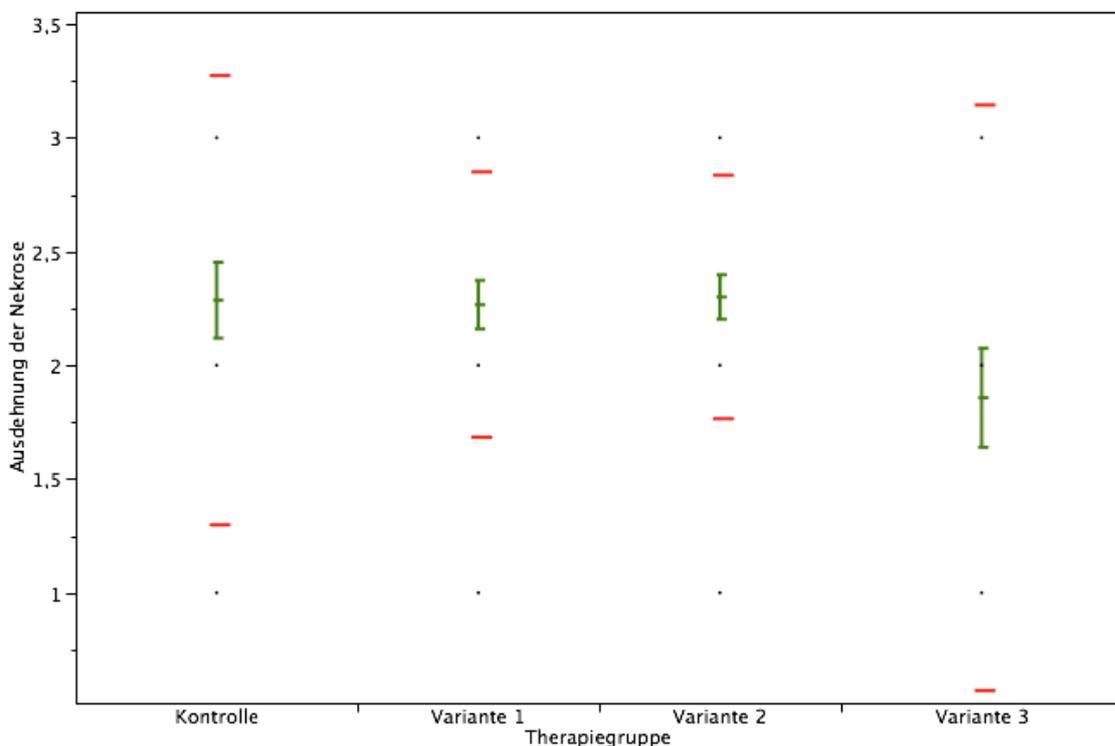


Abbildung 10: Ausdehnung der Nekrose bei Exitus nach Therapiegruppe (rote Linien: Standardabweichung; grüne Linie: Standardfehler)

Nach 48 Stunden (Abbildung 11) sah man die deutlich geringere Überlebensdauer der Tiere mit Nekrose der beiden inneren Zonen (c) gegenüber den weniger (b) oder gar nicht ausgeprägten Nekrosen (a), der Unterschied zwischen den Tieren mit gering ausgeprägter Nekrose und gar keiner Nekrose war gering.

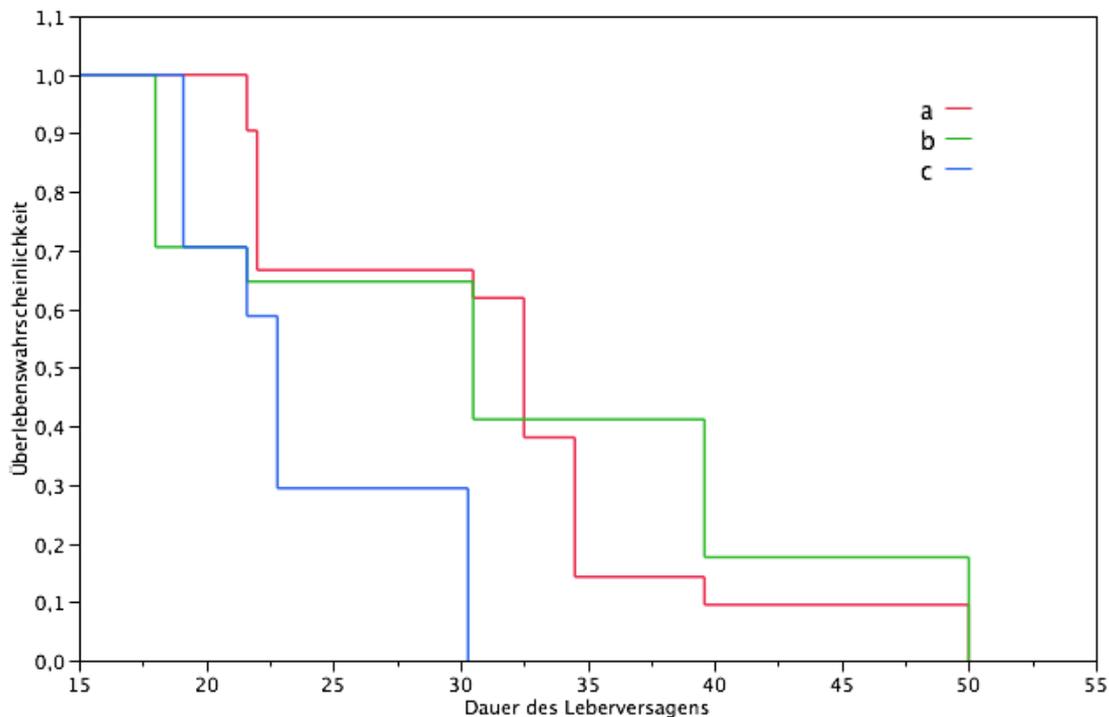


Abbildung 11: Ausmaß der Nekrose im Verhältnis zum Überleben im Leberversagen nach 48 Stunden (a: ohne Nekrose b: nur zentrale Nekrose, c: Nekrose zentral und intermediär), log-Rang-Test: $p=0,00005$

Zusammenfassend ergibt sich aus diesem Teil der Auswertung, dass die Variante 3 im Zusammenhang mit der Überlebenszeit im Leberversagen deutliche Vorteile aufwies, was auch mit dem günstigeren Verlauf der Nekrosen übereinstimmte. Hier zeigten sich vor allem nach 48 Stunden weniger ausgeprägte Nekrosen als in den anderen MARS-Therapiegruppen, was zusammen mit dem deutlich längeren Gesamtüberleben bei Variante 3 für einen deutlichen Vorteil dieser Therapie spricht. Allerdings fanden sich auch in der Kontrollgruppe geringer ausgeprägte Nekrosen als bei Variante 1 und Variante 2, in Zone III sogar weniger als bei Variante 3.

Also konnte man in diesem Fall klare Zeichen dafür finden, dass sowohl die Variante 1 als auch die Variante 2 in Bezug auf Protektion der Leber deutliche Nachteile haben gegenüber Variante 3 aber auch gegenüber der Kontrollgruppe, was sich mit statistischer Signifikanz in der Ausbreitung nekrotischer Areale im Verlauf nach 48 Stunden zeigt.

3.2.2 Leukozytenmenge

Im unten stehenden Diagramm (Abbildung 12) ist der zeitliche Verlauf der Leukozytenmenge abgebildet. Im Wesentlichen fiel bei diesem Verlauf auf, dass direkt bei Vergiftung (0.POP) nur in zwei der betrachteten Läppchen (2/135) vermehrte Leukozyten (xx) zu sehen waren. Diese Zahl wurde nach 24 Stunden größer (43/140). Nach 48 Stunden fanden sich dann wieder weniger Läppchen mit deutlich erhöhter Leukozytenmenge (8/55). Bei Exitus zeigten sich in einem Teil der Läppchen (32/130) vermehrte Leukozyten, aber es konnten in einigen Läppchen (14/130) keine oder kaum Leukozyten nachgewiesen werden.

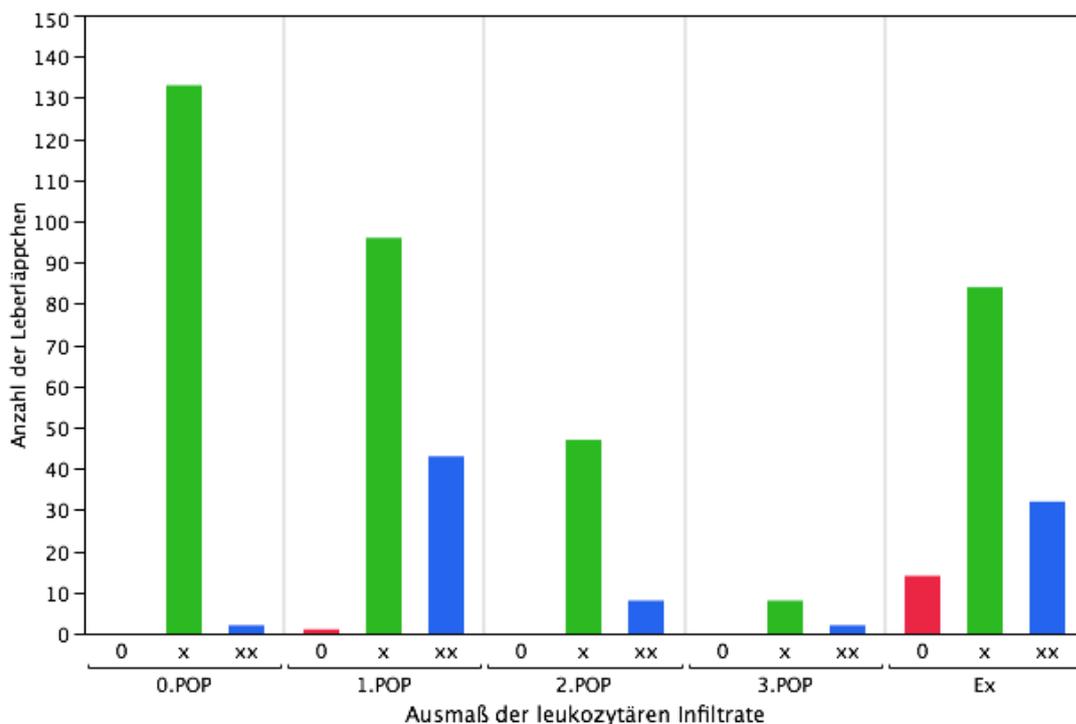


Abbildung 12: Leukozyteninfiltrate zu den einzelnen Zeitpunkten post-OP (x: normale Leukozyteninfiltrate, xx: vermehrte Leukozyteninfiltrate, 0: keine Leukozyteninfiltrate)

Bei Vergleich der einzelnen Therapiegruppen zu den einzelnen Zeitpunkten ergaben sich für die ersten beiden Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Nach 0 Stunden: $p=0,6$; nach 24 Stunden: $p=0,2$).

Nach 48 Stunden (Abbildung 13) unterschieden sich die einzelnen Gruppen, wobei Variante 1 den höchsten Anteil vermehrt infiltrierter Läppchen hatte und Variante 2 davon den zweithöchsten. Die Zahl der Läppchen mit erhöhten Leukozyten war bei Variante 2 (4/15) und am deutlichsten bei Variante 1 (4/5) erhöht. Dabei hatten die Kontrollgruppe und die Variante 3 keine vermehrten oder verminderten Leukozyten.

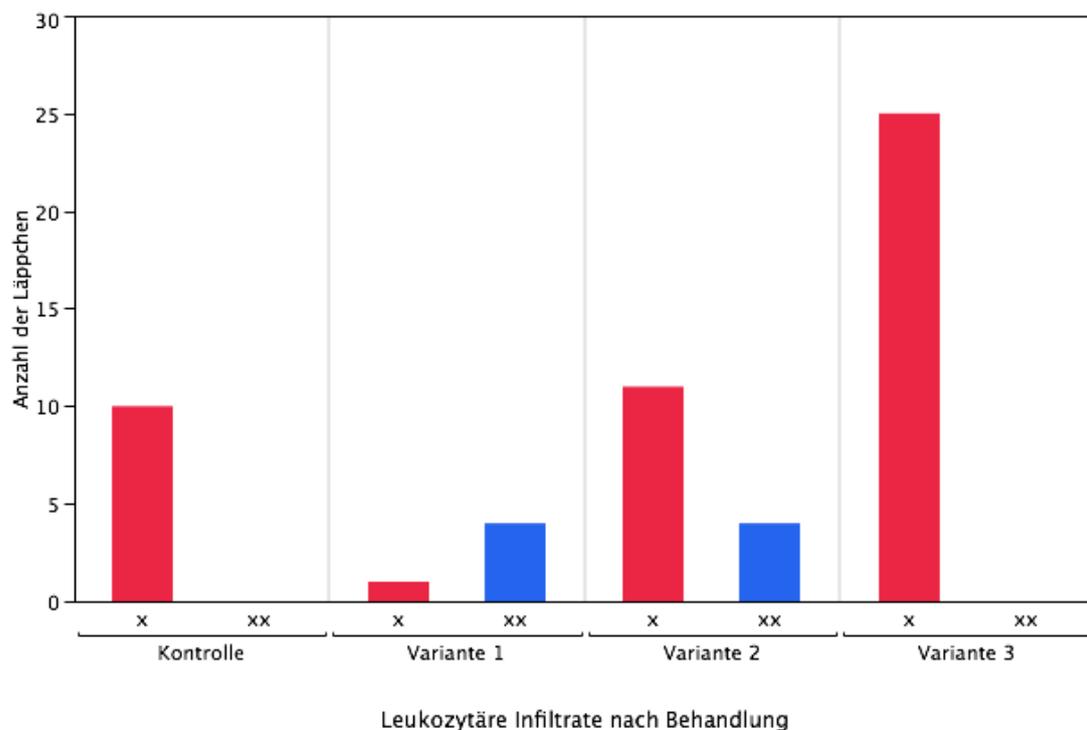


Abbildung 13: Leukozyteninfiltrate am zweiten postoperativen Tag nach Therapiegruppen (x: normale Leukozyteninfiltrate, xx: vermehrte Leukozyteninfiltrate)

Da nach 72 Stunden nur noch zwei Tiere mit Variante 3 lebten, entfiel der Vergleich der einzelnen Gruppen. Bei den verbleibenden Tieren konnten in zwei von zehn Leberläppchen vermehrte Leukozyten gesehen werden.

Bei Exitus ergab sich ein uneinheitliches Bild (Abbildung 14). In der Kontrollgruppe war der Anteil normal Läppchen 24 von 35, die restlichen 11 hatten erhohnte Leukozyten. Die Variante 3 hatte den höchsten Anteil an Läppchen mit wenigen oder gar keinen Leukozyten (9/35), der Anteil normaler Läppchen war 18 von 35 Läppchen und der Anteil deutlich infiltrierter Läppchen 8 von 35. Bei der Therapie mit Variante 2 ergab sich der geringste Anteil erhohpter Leukozyten (3/30) und verminderter Leukozyten (1/30) und der größte Anteil normaler Läppchen (26/30). Die Therapie mit Variante 1 hatte einen Anteil von 4 mit wenigen, 16 mit normalen und 10 mit erhohpter Leukozytenmenge von insgesamt 30 Läppchen. Der Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test war nicht signifikant ($p=0,09$)

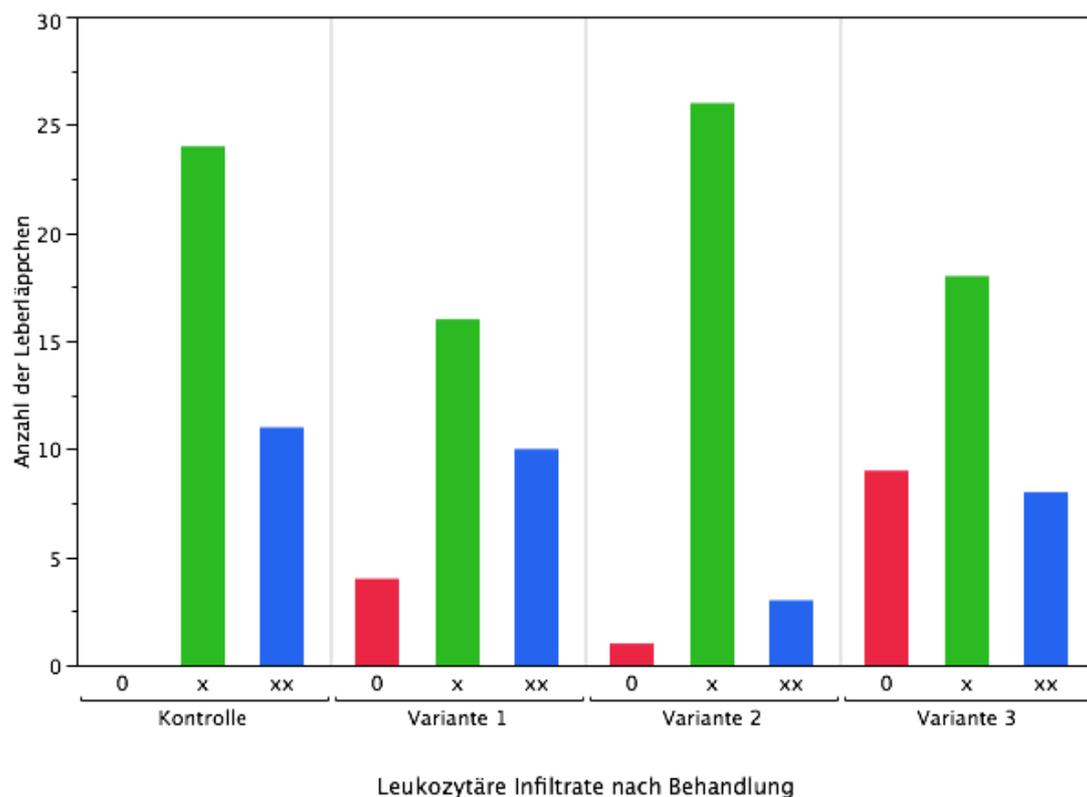


Abbildung 14: Leukozyteninfiltrate zum Zeitpunkt des Exitus nach Therapiegruppen (x: normale Leukozyteninfiltrate, xx: vermehrte Leukozyteninfiltrate, 0: keine Leukozyteninfiltrate)

Wie in Abbildung 15 bei Exitus dargestellt nahm mit Vermehrung der Leukozytenmenge auch die Nekrose zu. So sah man bei den vermehrten Leukozytenmengen den höchsten Anteil an Nekrosen aller drei Zonen (d) oder der beiden zentralen Zonen (c), Läppchen mit nur zentraler oder ohne Nekrose konnten bei vermehrten Leukozytenzahlen nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren nach 48 und bei Exitus signifikant (Wilcoxon-Kruskal-Wallis-test $p < 0,0001$).

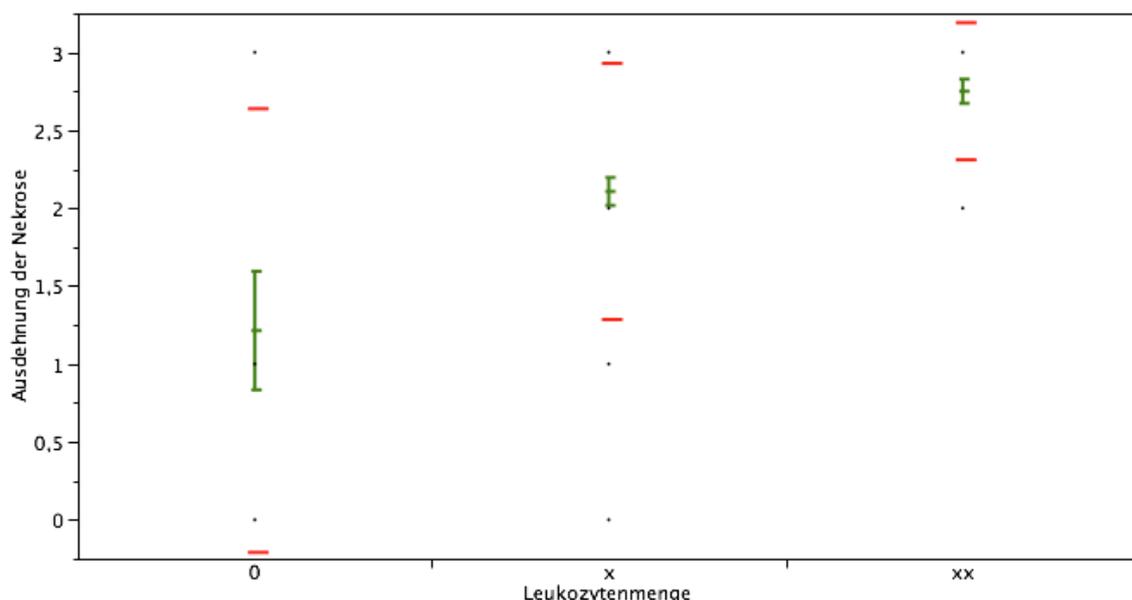


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Ausbreitung der Nekrose und Leukozyteninfiltraten bei Exitus (x: normale Leukozyteninfiltrate, xx: vermehrte Leukozyteninfiltrate, 0: keine Leukozyteninfiltrate, a: ohne Nekrose, b: nur zentrale Nekrose, c: Nekrose zentral und intermediär, d: vollständige Läppchennekrose)

Die Leukozytenmenge zeigte ebenso einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Dauer des Leberversagens 48 Stunden nach Vergiftung und bei Exitus. So war der Mittelwert der Zeit im Leberversagen bei den Tieren mit erhöhten Leukozyten nach 48 Stunden bei 20 Stunden, während bei der Gruppe mit den normalen Leukozytenmengen im Mittel die Zeit im Leberversagen 30 Stunden betrug (Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test $p = 0,02$). Bei Exitus hatte im Mittel die längste Überlebenszeit im Leberversagen die Gruppe die verminderte oder gar keine Leukozyten hatte (34 Stunden), die geringste

Überlebenszeit hatte bei Exitus die Gruppe mit den vermehrten Leukozyten (18 Stunden). Die Gruppe mit der normalen Leukozytenmenge bei Exitus überlebte im Mittel 23 Stunden im Leberversagen. Bei Exitus war das Ergebnis signifikant (Wilcoxon-Kruskal-Wallis $p < 0,0001$).

Wenn man den Zusammenhang zwischen Leukozyten und Nekrose in den einzelnen Therapiegruppen betrachtet, findet man bei den Läppchen mit geringen Leukozytenmengen bei Exitus bei Variante 1 und 2 nur Läppchen mit Nekrosen in allen drei Zonen, während bei Variante 3 Leberläppchen mit zentraler Nekrose und ohne Nekrosen zu finden waren. Bei den ausgewerteten Läppchen bei Exitus, die vermehrte Leukozyten zeigten, waren die Nekrosen in allen Therapiegruppen insgesamt ausgeprägter als in den Läppchen die normale Leukozytenzahlen aufwiesen. Hier steht also die Leukozytenmenge in einem Zusammenhang mit der Nekrosenausbreitung. Eine verminderte Leukozytenzahl zeigte nur bei Variante 3 einen deutlichen Vorteil bezüglich der Nekrose, während erhöhte Leukozytenmengen bei allen Gruppen einen Zusammenhang mit der vermehrten Ausbreitung nekrotischer Areale zeigten. Bei den Leberläppchen mit normaler Leukozytenzahl bei Exitus hatte die Variante 3 den höchsten Anteil der Läppchen mit Nekrose aller drei Zonen, allerdings fanden sich auch Läppchen mit nur zentraler oder gar keiner Nekrose. In der Kontrollgruppe zeigten sich bei den Läppchen mit normaler Leukozytenmenge mehr Läppchen mit keiner und nur zentraler Nekrose als bei Variante 1, 2 und 3, während der Anteil komplett nekrotischer Läppchen höher als bei Variante 1 und 2 aber niedriger als bei Variante 3 war.

Zusammenfassend lässt sich hier feststellen, dass eine erhöhte Leukozyteninfiltration insgesamt mit der Ausdehnung der Nekrosen zusammenhängt. Während verminderte Leukozyten bei Variante 3 mit einer verminderten Anzahl ausgeprägt oder komplett nekrotischer Läppchen einherging, waren die Läppchen mit verminderter Leukozyteninfiltration bei Variante 1 und 2 komplett nekrotisch.

Bei den Tieren mit vermehrten Leukozyten fanden sich deutlich niedrigere Überlebenszeiten im Leberversagen als bei den Tieren mit geringer Leukozytenmenge, sodass die Überlebenszeit im Leberversagen mit der Ausbreitung der Nekrose und dem Ausmaß der Leukozyten zusammenhing.

3.3 Proliferationsraten der Hepatozyten

Mittels des Anteils der KI67-positiven Zellen konnte nun neben dem morphologischen Aspekt der Nekrose auch die Regeneration innerhalb des Läppchens anhand der Anzahl der sich teilenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl beurteilt werden. Wichtig war hier wiederum die Frage, ob sich hierbei eine direkte Korrelation zur Überlebenszeit und zur Therapiegruppe ergibt. Es soll auch die Proliferation der einzelnen Zonen verglichen werden.

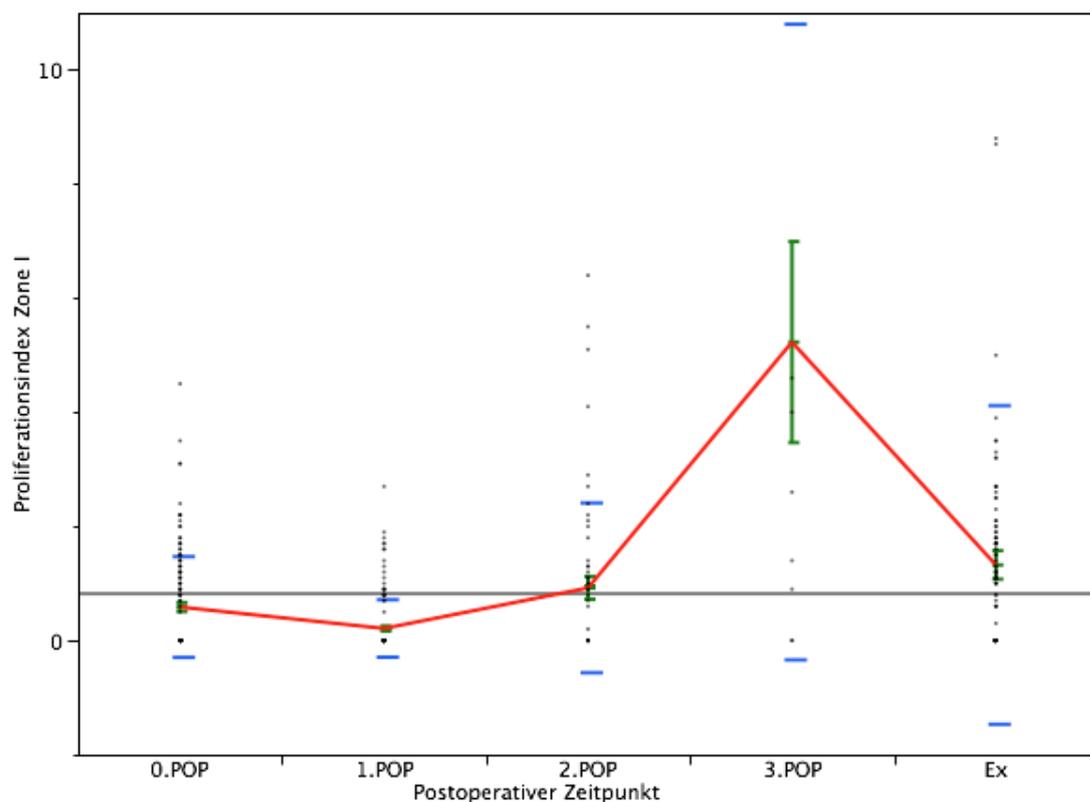


Abbildung 16: Postoperativer Verlauf der Proliferationsraten in Zone I (blaue Linien: Standardabweichung, grüne Linien: Mittelwert und Standardfehler)

Wie in der Abbildung 16 für Zone I dargestellt, findet sich in Zone I und Zone II ein Absinken vom Ausgangswert vor Vergiftung (Zone I: $0,59 \pm 0,89$ Prozent; Zone II: $0,26 \pm 0,58$ Prozent) auf den Minimalwert nach 24 Stunden (Zone I: $0,21 \pm 0,5$ Prozent; Zone II: $0,06 \pm 0,28$ Prozent) und ein erneutes Ansteigen der Proliferationsrate im weiteren Verlauf (nach 48 Stunden: Zone I: $0,92 \pm 1,49$ Prozent; Zone II: $0,26 \pm 0,80$ Prozent). Wenn man die Werte nach 72 Stunden aufgrund der geringen Zahl der überlebenden Tiere außer Acht lässt, zeigt sich der höchste Wert der Proliferationsrate bei Exitus (Zone I: $1,32 \pm 2,80$ Prozent; Zone II: $0,90 \pm 3,81$ Prozent) (Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test jeweils $p < 0,00001$). In Zone III sinkt die Proliferationsrate von dem Wert vor der Vergiftung ($0,13 \pm 0,48$ Prozent) über den Wert nach 24 Stunden ($0,04 \pm 0,28$ Prozent), bis die Proliferationsrate nach 48 Stunden ihren minimalen Wert hat ($0,03 \pm 0,22$ Prozent) und steigt in der Folge wieder an. Im Vergleich der einzelnen Zonen sind die höchsten Proliferationsraten dabei immer in Zone I zu sehen, die zweithöchsten in Zone II und die geringste Proliferationsrate findet sich immer in Zone III. Dies weist darauf hin, dass die Regeneration von der äußeren Zone in die innere Zone fortschreitet (siehe Abbildung 19).

Im Vergleich der Therapiegruppen zeigte sich nach 24 Stunden in Zone I kein Unterschied (Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,7$). Nach 48 Stunden wurde der Unterschied zwischen den Therapiegruppen größer (siehe Abbildung 17), wobei hier im grafischen Vergleich die Therapiegruppe mit Variante 3 ($1,5 \pm 1,9$ Prozent) den höchsten Wert und die Therapiegruppe mit Variante 1 ($0,3 \pm 0,4$ Prozent) den niedrigsten Wert aufwies. Die Kontrollgruppe und die Gruppe, die mit Variante 2 therapiert wurden zeigten gleiche Werte (jeweils $0,45 \pm 0,8$ Prozent). Die Ergebnisse unterschieden sich hier nicht signifikant ($p = 0,08$).

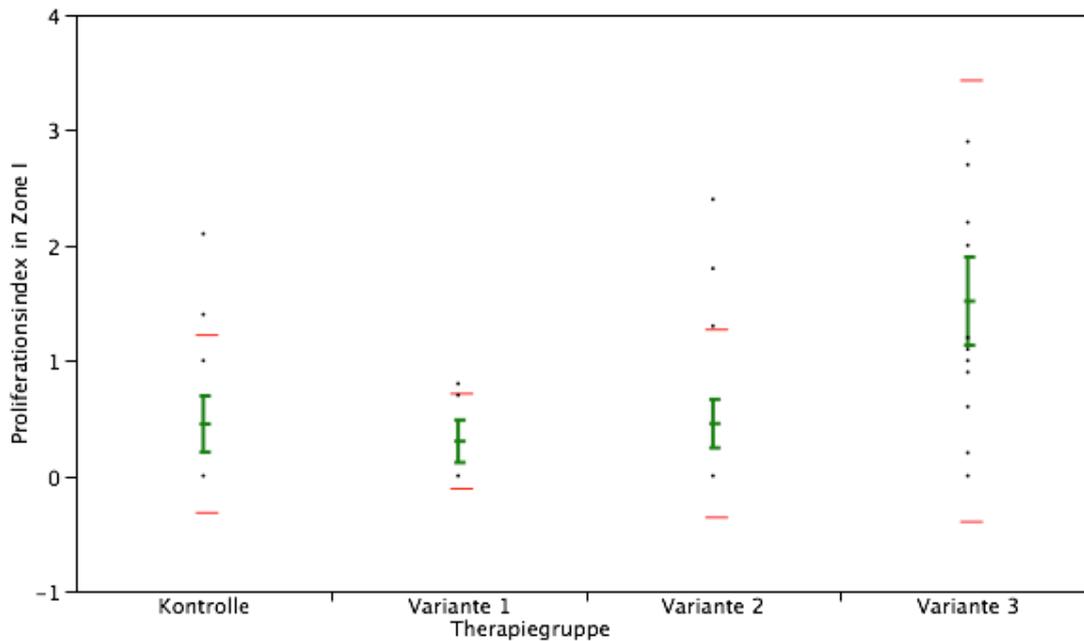


Abbildung 17: Vergleich der Proliferationsrate in Zone I nach 48 Stunden nach Therapiegruppe (rote Linien: Standardabweichung; grüne Linie: Mittelwert und Standardfehler)

Die insgesamt höchste Proliferationsrate in Zone hatten die beiden nach 72 Stunden noch lebenden Tiere, die Proliferationsrate betrug hier $5,2 \pm 5,6$ Prozent.

Bei Exitus (s. Abbildung 18) fand sich die niedrigste Proliferationsrate in Zone I in der Kontrollgruppe ($0,23 \pm 0,45$ Prozent). Die Variante 1-Gruppe ($0,83 \pm 1,1$ Prozent) hatte eine zur Variante 2 ($1,2 \pm 1,1$ Prozent) vergleichbare mittlere Proliferationsrate. Bei Exitus zeigte schließlich die Variante 3 mit $2,9 \pm 4,7$ Prozent die höchste Proliferationsrate, dabei zeigte sich in der statistischen Auswertung ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$).

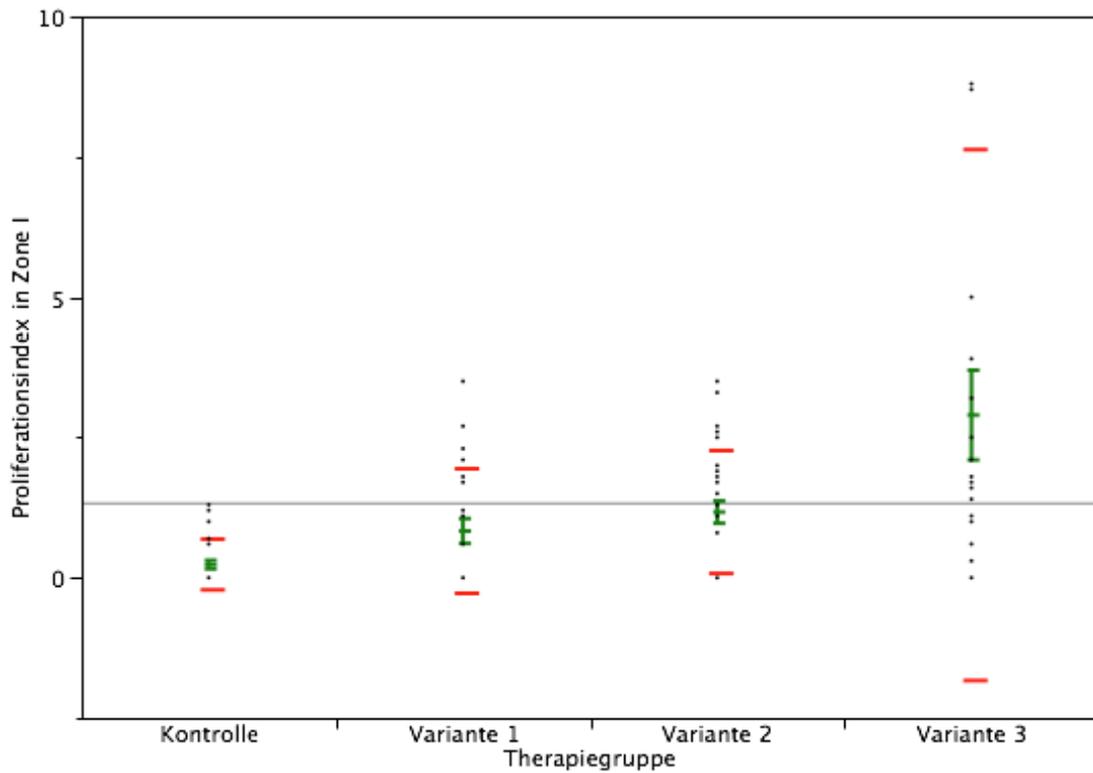


Abbildung 18: Mittlere Proliferationsraten in Zone I bei Exitus nach Therapiegruppen. (rote Linien: Standardabweichung; grüne Linien: Mittelwert und Standardfehler)

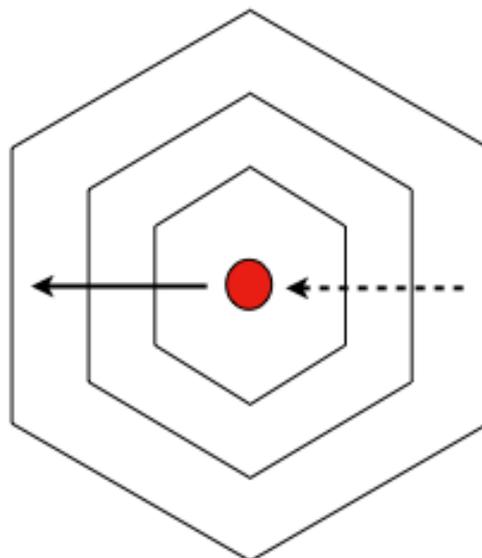


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines Leberläppchens mit der Richtung der Ausbreitung der Nekrose (durchgezogener Pfeil) und der Richtung der Regeneration (gestrichelter Pfeil)

4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen den Zusammenhang zwischen der Ausdehnung der Nekrose, die statistisch mit vermehrten Leukozyten einhergeht, und einem verkürzten Überleben im Leberversagen. Hier fand sich bei Variante 3 im Verlauf eine geringer ausgeprägte Nekrose und weniger leukozytäre Infiltrate, was auch das längste Überleben im Leberversagen verglichen mit den Vergleichsgruppen erklärte. Die Auswertung der Proliferation ergab keinen Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und Überleben im Leberversagen. Es zeigte sich jedoch, dass die Proliferation im äußeren Bereich der Läppchen deutlich stärker war und erst im Verlauf in dem inneren Bereich de Läppchens anstieg.

Es ergaben sich bereits in der Vergangenheit Schwierigkeiten bei der Durchführung eines Schweinmodells, welches zur Induktion des Leberversagens Paracetamol verwendet wurde (22; 49). Bei einer Bolusgabe Paracetamol ergaben sich Probleme mit einer Methämoglobinämie, einem zu kurzen therapeutischen Fenster beziehungsweise einer zu hohen Spontanregenerationsrate je nach Größe der Paracetamolbolusgabe. In diesem Modell hier wurde von den Einzelbolusgaben abgewichen, um die Kriterien, die von einem Tiermodell verlangt werden (68), zu erfüllen. Durch das angewandte Modell (70) konnte vor allem eine größere Reproduzierbarkeit, das ausreichende therapeutische Fenster und auch der Tod im akuten Leberversagen in einem Großtiermodell am Schwein gewährleistet werden. Als reversibel erwies sich das Leberversagen insofern, dass sich im Verlauf Zeichen der Regeneration zeigten, ohne dass die Tiere das Leberversagen überlebten. Das Modell war reproduzierbar, sodass eine ausreichende Anzahl vergleichbarer Versuchstiere in die Studie eingeschlossen werden konnte. Andere Probleme, wie ein Überleben des Leberversagens oder eine relevante Methämoglobinämie zeigten sich nicht (6; 70).

Das hier verwendete Modell (70) ermöglichte also im Vergleich zu bereits beschriebenen Intoxikationsmodellen mit Paracetamol die Evaluation des MARS mit grundsätzlich gegebener Vergleichbarkeit unter den Gruppen.

Bei Betrachtung der Überlebenszeiten nach Eintritt des Leberversagens zeigten sich die oben gezeigten signifikanten Unterschiede. So erwies sich die Variante 3 in Bezug auf die längere Überlebenszeit als signifikant von den anderen verschieden.

Variante 3 unterschied sich von den anderen Gruppen durch die Behandlung mit dem nachweislich hepatoprotektiven N-Acetylcystein, das auch in der Humanmedizin als Antidot bei Paracetamolintoxikationen verwendet wird und einen positiven Effekt auf den Verlauf des Leberversagens hat (61), auch längere Zeit nach Einnahme der Paracetamoldosis (21; 58). Eine genaue Differenzierung zwischen dem Effekt der Variante 3 und dem Effekt des N-Acetylcysteins war nicht möglich.

Bei Variante 1 war das Überleben im Leberversagen signifikant kürzer, sodass diese Variante sich negativ auf das Überleben auswirkte.

Ein wichtiger histologischer Aspekt dieser Studie, ist die Ausdehnung der Nekrose, also wie groß der Anteil zerstörten Lebergewebes ist. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit sich die Ausdehnung der Nekrosen auf die Überlebenszeit auswirkt.

Bei Auswertung der HE-gefärbten Präparate zeigte sich nach 48 Stunden, dass sowohl die noch lebenden Tiere der Variante 1 als auch die der Variante 2 deutlich ausgeprägter Nekrosen aufwiesen als die beiden anderen Gruppen. Hier wies die Variante 3 im Bereich um die Zentralvene sogar häufiger Nekrosen auf als in der Kontrollgruppe. Die Nekrosen in der Kontrollgruppe waren allerdings, wenn sie vorhanden waren, stärker ausgeprägt, sodass in der Kontrollgruppe häufiger die Zone II betroffen war. Die Ergebnisse waren zu diesem Zeitpunkt signifikant. Die Variante 1 und die Variante 2 zeigten also zu diesem Zeitpunkt was die Nekrose anging deutlich schlechtere Ergebnisse. Allerdings wirkte sich dieser Nachteil bei Variante 2 nur gegenüber Variante 3 aus, gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich kein Nachteil. In der Kontrollgruppe lebten nach 48 Stunden weniger Tiere als bei der Variante 2. Allerdings zeigte sich insgesamt ein eindeutiger statistischer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Nekrose und dem Überleben im Leberversagen. So

zeigten die Tiere, die keine oder nur eine gering ausgeprägte Nekrose nach 48 Stunden hatten, gegenüber den Tieren mit ausgeprägter Nekrose eine längere Überlebenszeit im Leberversagen.

Publiziert sind einerseits Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Ausdehnung der Nekrose und der Überlebensprognose sahen (2; 16). So konnte in diesen Fällen eine statistische Korrelation zwischen der Lebernekrose und der Prognose hergestellt werden. Demgegenüber wurde von einigen Autoren der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Lebernekrose und der Prognose nicht gesehen (19).

Bei Betrachtung der Leukozyteninfiltrate in den Leberläppchen wurden in den Gruppen, die vermehrt Nekrosen aufwiesen, auch vermehrt Leukozyten nachgewiesen. Dies sieht man in besonderem Maße am zweiten postoperativen Tag. Das weist daraufhin, dass durch den verstärkten Leberzelluntergang auch eine verstärkte Entzündungsreaktion stattfindet. Bei Exitus zeigte die Kontrollgruppe den höchsten Anteil stark infiltrierter Lläppchen, dafür aber keine wenig oder gar nicht infiltrierte Lläppchen. In den MARS-Gruppen fiel auf, dass alle drei Gruppen Lläppchen ohne beziehungsweise mit wenig Leukozyten aufwiesen, dabei die Variante 2-Gruppe nur eines. Stark infiltrierte Lläppchen fanden sich in allen Gruppen. Insgesamt zeigte hier die Variante 2 den höchsten Anteil normal infiltrierter Lläppchen. Bei Variante 3 waren die meisten Tiere mit reduzierter Leukozyteninfiltration, was auch wiederum mit der höheren Anzahl weniger oder gar nicht nekrotischer Lläppchen und verbessertem Überleben im Leberversagen einherging. Zusammenfassend muss dieser Zusammenhang so interpretiert werden, dass bei vermehrter Nekrose zumeist vermehrt Leukozyteninfiltrate gefunden wurden, was wiederum mit einem kürzeren Überleben im Leberversagen korrelierte. Ob aufgrund vermehrter Nekrose vermehrt Leukozyten eingewandert sind oder vermehrte Leukozyten eine vermehrte Nekrose bedingen, konnte aufgrund der dargestellten Ergebnisse nicht beantwortet werden.

Leukozyten sind wichtig für die Regeneration und Proliferation der Hepatozyten. In einer Studie fanden Selzner et. al. (64), dass bei Ausschalten der Leukozytenadhäsion über ICAM-1-Moleküle es zu einer verminderten Proliferation der Hepatozyten nach partieller Leberresektion kommt.

In der Literatur lässt sich ein Zusammenhang zwischen Leukozyten, vor allem neutrophilen Granulozyten, und Nekrose finden (29; 57). Wie hier beschrieben wurde, kommt es bei einer toxischen Schädigung durch die Ausschüttung von Zytokinen durch die geschädigten Leberzellen zu einer Lyse der betroffenen Zellen durch die neutrophilen Granulozyten. Dieser Zusammenhang würde indirekt einen Hinweis geben, dass die Variante 2 und die Variante 1 eventuell den Zytokinpiegel so beeinflussen, dass daraus eine erhöhte Lyse schon geschädigter Leberzellen und eine vermehrte Nekrose resultiert.

Der Zusammenhang zwischen Leukozyten und Nekrose im Paracetamol-induzierten Leberversagen wird in der Literatur aber unterschiedlich gesehen.

In einer tierexperimentellen Studie beschrieben ISHIDA et. al. (27) einen verstärkten Schaden im durch Paracetamol induzierten Leberversagen durch neutrophile Granulozyten, die in das Lebergewebe eingewandert waren und dort den Leberschaden vermehrten. Makrophagen zeigten hier einen positiven Effekt auf den Verlauf. Letztlich zeigten Untersuchungen des Einflusses des Monozyten/Makrophagensystems auf den Verlauf des Leberversagens unterschiedliche Ergebnisse, sodass hauptsächlich zwei Subpopulationen diskutiert wurden. Zum einen die Gruppe der M1-Makrophagen, die im Wesentlichen während der frühen Phase der Intoxikation eine proinflammatorische Wirkung haben und damit den Zellschaden vermehren. Die andere Gruppe der M2-Makrophagen hat einen antiinflammatorischen Effekt und trägt wahrscheinlich über Zytokinfreisetzung zu einer Proliferation des übriggebliebenen Lebergewebes und des Stammzellpools bei (38). In einer Studie von ANTONIADES et al. (3) wird eine Proliferation der residenten Makrophagen der Leber und ein Einwandern zirkulierender Monozyten aufgeführt, die sowohl bei der Inflammation und Nekrose wie auch bei der Regeneration gefunden werden und dort jeweils eine wichtige Rolle spielen.

In einer experimentellen Studie mit CD18-defizienten Mäusen und dem damit vermindertem Auswandern neutrophiler Granulozyten in das Lebergewebe bei toxischer Leberschädigung wurde im Gegensatz zu anderen Ursachen des akuten Leberversagens kein Unterschied bei Paracetamolintoxikation das Ausmaß der Nekrose betreffend zwischen CD18-defizienten Mäusen und normalen Mäusen gesehen (77). Das Ausmaß der Nekrose wurde dieser Studie zufolge vielmehr durch die Zerstörung der Hepatozyten durch den Zellschaden des Paracetamols erklärt als durch einen zusätzlichen Schaden durch Lyse der Hepatozyten durch in das Gewebe eingewanderte neutrophile Granulozyten. Ebenso konnte bei durch IL-1 β -vermittelter vermehrter Akkumulation neutrophiler Granulozyten im Lebergewebe keine verstärkte Schädigung der Leber nachgewiesen werden (78).

Einen positiven Effekt zur Leberregeneration wird über das Komplementsystem, insbesondere den Faktoren C3a und C5a, über einen Interleukin-4 und Interleukin-6 vermittelten Effekt natürlichen Killerzellen zugeschrieben. In diesen Studien wurde eine deutliche Verminderung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in Mäusen, die keine Komplementfaktoren C3a und C5a hatten, gesehen (14; 43; 67).

Studien, die verschiedene proinflammatorische (TNF-alpha, Interleukin 8) und antiinflammatorische Zytokine (Interleukin 6 und Interleukin 10) im Bezug zur MARS-Therapie untersuchten, zeigten keinen Effekt auf die Zytokinspiegel (25; 26), andere Studien konnten wiederum ein Absinken des antiinflammatorischen Interleukins 10 nachweisen (28). Eine Studie beschrieb einen Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln von Interleukin 6 und einer schlechten Prognose im Leberversagen (26). Dem gegenüber steht eine Studie, die eine Reduktion von TNF-alpha, Interleukin 1 beta und Interleukin 6 nach einer MARS-Therapie nachweisen konnte, was eine deutlich bessere Prognose mit sich brachte (15).

Die Auswertung der Proliferationsrate mittels Ki-67-positiver Zellen zeigte, dass die Variationsbreite schon bei der ersten Biopsie vor Vergiftung sehr groß war ($0,6 \pm 0,9$ Prozent) als Ausgangspunkt für den Verlauf. Der weitere Verlauf ergab in der Betrachtung aller Tiere einen Rückgang der Mitoserate ($0,21 \pm 0,5$

Prozent), da durch das Paracetamol beziehungsweise dessen Metaboliten neben der Induktion des Zelluntergangs auch die Hemmung der Mitose bewirkt wurde (45; 24). Nach 48 Stunden stieg die Mitoserate ($0,92 \pm 1,49$ Prozent) bei sinkenden Paracetamolspiegeln. Bei Exitus war die Mitoserate oberhalb des Ausgangswertes ($1,32 \pm 2,80$ Prozent). Letztlich ließ sich dieser Verlauf auch in den einzelnen Therapiegruppen nachvollziehen, ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test zeigte sich erst bei Exitus, wo die Variante 3-Gruppe die höchsten Werte in Zone I aufwies, während die Kontrollgruppe hier die niedrigste Proliferationsrate hatte. Es zeigte sich in dieser Studie vielmehr, dass Mittels der Proliferationsraten weder eine Prognose noch eine Zustandsaussage im Verlauf in diesem Tiermodell gemacht werden konnte.

Es gibt aber auch Studien, die aus der Histologie und der Anzahl Ki67-positiver Zellen einen prognostischen Wert ablesen. Katoonizadeh et. al. (34) beschreiben eine Korrelation zwischen Proliferation von Hepatozyten, Verlust von Hepatozyten und Aktivierung von hepatischen Stammzellen. In der akuten alkoholischen Steatohepatitis fand sich ebenso eine Korrelation zwischen Proliferationsrate und dem Verlauf der Erkrankung (18). Dagegen stehen Ergebnisse anderer Studien, welche keinen Unterschied zwischen den Proliferationsraten der Hepatozyten im akuten Leberversagen mit und ohne fulminanten Verlauf sehen (80).

In wissenschaftlichen Untersuchungen wurde vor allem eine periportale Proliferation beschrieben (40; 56), die hier bei der Betrachtung der einzelnen Zonen auch deutlich zu sehen ist. Vor allem ist der Anstieg der KI67-positiven Zellen im äußersten Bereich des Läppchens am deutlichsten. Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen also den Schluss zu, dass die Regeneration der Läppchen durch die Teilung überlebender Hepatozyten im Randbereich des Läppchens stattfindet und im Verlauf zu einem deutlicheren Anstieg der Hepatozyten in den inneren Zonen führt (40).

Festzuhalten bleibt, dass mittels der Ki 67-Färbung kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Therapiegruppen ausgemacht werden konnte. Es zeigte sich ein typischer Verlauf KI67-positiver Zellen mit einem Minimum 24 Stunden nach Intoxikation. Die nekrotischen Läppchen

regenerierten anfangs vorwiegend durch die Teilung von Hepatozyten in der Läppchenperipherie um im Verlauf auch vermehrt Proliferation im Zentrum zu zeigen.

Die Rolle der Leberbiopsie ist in der klinischen Praxis zumeist dem Verlauf der Blutparameter und der Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie untergeordnet. Die gängigen klinischen Bewertungssysteme beziehen die Leberbiopsie nicht in ihre Kriterien mit ein (King's College Kriterien, APACHE II score, MELD, SOFA) (4; 12; 13; 46). Auch die Leitlinien der AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) sehen keine Leberbiopsie zur weiteren Abschätzung des Leberschadens bei Paracetamolintoxikation vor (55). Sicherlich müssen hierbei die möglichen Risiken in Betracht gezogen werden, insbesondere das erhöhte Blutungsrisiko bei schlechten Gerinnungswerten im akuten Leberversagen (66).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich jedoch eine prognostische Aussage über die Überlebenszeit im akuten Leberversagen anhand von einfachen Kriterien, wie Menge der infiltrierenden Leukozyten und Ausmaß der Nekrose, machen.

Diskutiert werden soll hier nun die Wirkung der einzelnen MARS-Systeme gegenüber der Kontrollgruppe. Bei Betrachtung der Zeit im Leberversagen, wobei das Leberversagen bei überschreiten eines INR-Wertes von 1,5 definiert war, zeigte sich, wie bereits oben beschrieben, dass Variante 1 den anderen Systemen und der Kontrollgruppe unterlegen und Variante 3 den anderen Gruppen überlegen war. Bei klarer Evidenz für die Wirksamkeit einer N-Acetylcysteintherapie in der Literatur, lässt sich der Überlebensvorteil dieser Gruppe im Leberversagen durch das N-Acetylcystein erklären, der auch bei einer Intoxikation mit hohen Dosen belegt ist (42). Über den Effekt der Variante 3 gegenüber dem Effekt des N-Acetylcysteins allein kann hier keine genaue Aussage gemacht werden.

Die Auswertung der Histologie zeigte, dass es in Abhängigkeit von der Nekrose und den vermehrten Leukozyteninfiltraten im Leberläppchen das Überleben im

Leberversagen kürzer wurde, was ein Abfiltrieren proinflammatorischer Zytokine nahelegt mit dem damit verbundenen verminderten Untergang an Lebergewebe. Hinweise auf eine unterschiedliche Auswirkung auf die Proliferation der MARS-Systeme ließen sich nicht finden.

Die Literatur erbringt in dieser Hinsicht selbst keine einheitlichen Hinweise auf die Wirksamkeit des MARS, wobei in den veröffentlichten Berichten keine unterschiedlichen MARS verwendet wurden. In der Regel beschreibt die Literatur Anwendungen im klinischen Bereich, sodass also nicht von einer Standardisierung ausgegangen werden kann.

Vielmehr wurde ein eventueller Vorteil des MARS vor dem Hintergrund der Überlebensverlängerung im akuten Leberversagen und damit einer erhöhten Chance der Spontanregeneration beziehungsweise einer Überbrückung der Zeit bis zur Lebertransplantation nicht klar gezeigt, auch ohne in der Leberbiopsie mehr intaktes Lebergewebe zu sehen (35; 36). Ein klarer Vorteil scheint allerdings die Verbesserung der hepatischen Enzephalopathie und eines cholestatischen Pruritus zu sein (35; 59). NOVELLI et al. (50; 51) wiederum schließen aus ihrer klinischen Anwendung in der Pädiatrie in Kombination mit einer Intensivtherapie einen Vorteil, den sie aus dem Vergleich von Labordaten (Ammoniak, Bilirubin) und Intensivscores (Glasgow Coma Scale) ableiten. Ebenso wiesen MITZNER et al. (48) einen deutlichen Vorteil mitunter den arteriellen Mitteldruck betreffend nach. So zeigten LAI et al. (37), dass sich der arterielle Mitteldruck zwar während der ersten Anwendung verbesserte, bei der zweiten Anwendung aber nicht mehr besser war. WIGG et al. (76) konnten nicht die Vorteile im Experiment im klinischen Gebrauch erkennen.

Eine positive Auswirkung des MARS auf die histologische Regeneration wird nicht beschrieben (s. DORIA et al.) (17). Ebenso konnte auch keine Reduktion des proapoptotischen Effekts durch das MARS gesehen werden (60). Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie. Eine verbesserte Regeneration gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich lediglich bei Variante 3, die zudem mit N-Acetylcystein behandelt worden war.

In Bezug auf das Gesamtüberleben bei Leberversagen nach Lebertransplantation bestand unter MARS-Therapie kein Vorteil gegenüber der Plasmapherese, was die 90-Tage-Überlebensrate anging (39). Hierbei zeigte sich unter MARS-Therapie eine Verbesserung in den Blutspiegeln von Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin und Ammoniak. Nach der Plasmapherese fanden sich Verbesserungen in der Prothrombinzeit, des Bilirubins, der GOT, der alkalischen Phosphatase und des Albumin (39). Im Vergleich liegt der Vorteil des MARS vor allem in der Verbesserung der hepatischen Enzephalopathie (39). Zusammenfassend bleiben aber bis heute eindeutige Empfehlungen für den Gebrauch des MARS im akuten Leberversagen aus (7).

Demnach könnten aufgrund der oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen Nekrose, leukozytären Infiltraten und Überleben im Leberversagen, wobei besonders Variante 3 des MARS besser und Variante 1 schlechter als die Kontrollgruppe und Variante 2 abschnitten, immunregulatorische Mechanismen neben der Reduktion der Giftstoffe im Blut als Erklärung für die Unterschiede vorhanden sein.

Zudem folgt aus den oben dargestellten Ergebnissen und der hier diskutierten Literatur, dass eine gezielte immunmodulatorische Therapie, sei es medikamentös oder durch Abfiltrieren proinflammatorischer Zytokine aus dem Blut, einen positiven Effekt haben könnte.

5 Zusammenfassung

Das akute Leberversagen hat eine hohe Letalität, weshalb häufig eine überbrückende Therapie zusätzlich zur intensivmedizinischen Versorgung notwendig ist, um den Zeitraum zu einer Lebertransplantation oder der Spontanregeneration der Leber zu überbrücken. Das MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System) ist ein Leberunterstützungsverfahren, das auf dem Abfiltrieren an Albumin gebundener Stoffe, insbesondere Giftstoffe, basiert.

Zur Evaluation des MARS wurden drei verschiedene MARS-Typen und eine standardisierte Kontrollgruppe in einem Tiermodell mit durch Paracetamol induziertem Leberversagen am Schwein verglichen. Es wurden alle 24 Stunden Leberbiopsien entnommen, die anschließend histologisch mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der immunhistochemischen Reaktion für das Ki-67-Antigen als Proliferationsmarker ausgewertet wurden.

Es fand sich ein Zusammenhang zwischen der Ausdehnung der Nekrose, der Menge der leukozytären Infiltrate und dem Überleben im Leberversagen. Bei ausgedehnten Nekrosen fanden sich vermehrt leukozytäre Infiltrate und ein verkürztes Überleben im Leberversagen. Die Auswertung der Proliferation mittels Ki-67-Immunhistochemie ließ keinen Zusammenhang zu den anderen Parametern erkennen. Im Vergleich der verschiedenen MARS-Systeme konnte die Variante 3 ein signifikant besseres Überleben gegenüber den anderen Therapiegruppen aufweisen, die Variante 1 war signifikant schlechter, die Variante 2 hatte mit der Kontrollgruppe vergleichbare Ergebnisse.

In Zusammenschau mit der diskutierten Literatur zeigt sich, dass ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Leberschädigung und den Leukozyten, die in das Lebergewebe einwandern, besteht und dass daraus gefolgert werden kann, dass als mögliche Optionen in Zukunft durch gezielte Beeinflussung der Immunreaktion durch medikamentöse Therapie oder Abfiltrieren aus dem Blut der Leberschaden gemildert und das Überleben verlängert werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Aktories, K., U. Förstermann, et al. (2005). "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie." 240-241.
2. Alonso, E. M., R. J. Sokol, et al. (1995). "Fulminant hepatitis associated with centrilobular hepatic necrosis in young children." J Pediatr 127(6): 888-894.
3. Antoniadou, C. G., A. Quaglia, et al. (2012). "Source and characterisation of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans." Hepatology.
4. Bailey, B., D. K. Amre, et al. (2003). "Fulminant hepatic failure secondary to acetaminophen poisoning: a systematic review and meta-analysis of prognostic criteria determining the need for liver transplantation." Crit Care Med 31(1): 299-305.
5. Baudouin, S. V., P. Howdle, et al. (1995). "Acute lung injury in fulminant hepatic failure following paracetamol poisoning." Thorax 50(4): 399-402.
6. Bélanger, M. and R. F. Butterworth (2005). "Acute Liver Failure: A Critical Appraisal of Available Animal Models" Metab Brain Dis 20 (4): 409 - 423.
7. Bernal W, A. G., Dhawan A, et al. (2010). "Acute liver failure." Lancet 376: 190 - 201.
8. Brok, J., N. Buckley, et al. (2006). "Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose." Cochrane Database Syst Rev(2): CD003328.
9. Bucher, O. and H. Wartenberg (1989). "Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen." 418-431.
10. Camus, C., S. Lavoue, et al. (2006). "Molecular adsorbent recirculating system dialysis in patients with acute liver failure who are assessed for liver transplantation." Intensive Care Med 32(11): 1817-1825.
11. Canbay, A., C. Jochum, et al. (2009). "Acute liver failure in a metropolitan area in Germany: a retrospective study (2002 - 2008)." Z Gastroenterol 47(9): 807-813.
12. Cholongitas, E., E. Theodoridou, et al. (2011). "Comparison of SOFA score to king's criteria and MELD score in the prognosis of acetaminophen-induced acute liver failure." Liver Transpl.
13. Craig, D. G., A. C. Ford, et al. (2010). "Systematic review: prognostic tests of paracetamol-induced acute liver failure." Aliment Pharmacol Ther 31(10): 1064-1076.
14. DeAngelis, R. A., M. M. Markiewski, et al. (2012). "A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration." J Immunol 188(2): 641-648.

15. Di Campli, C., M. A. Zocco, et al. (2005). "The decrease in cytokine concentration during albumin dialysis correlates with the prognosis of patients with acute on chronic liver failure." Transplant Proc 37(6): 2551-2553.
16. Donaldson, B. W., R. Gopinath, et al. (1993). "The role of transjugular liver biopsy in fulminant liver failure: relation to other prognostic indicators." Hepatology 18(6): 1370-1376.
17. Doria, C., L. Mandala, et al. (2006). "Fulminant hepatic failure bridged to liver transplantation with a molecular adsorbent recirculating system: a single-center experience." Dig Dis Sci 51(1): 47-53.
18. Fang, J. W., G. L. Bird, et al. (1994). "Hepatocyte proliferation as an indicator of outcome in acute alcoholic hepatitis." Lancet 343(8901): 820-823.
19. Gazzard, B. G., B. Widdop, et al. (1977). "Early prediction of the outcome of a paracetamol overdose based on an analysis of 163 patients." Postgrad Med J 53(619): 243-247.
20. Gonzalez, F. J. (2005). "Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1." Mutat Res 569(1-2): 101-110.
21. Harrison, P. M., R. Keays, et al. (1990). "Improved outcome of paracetamol-induced fulminant hepatic failure by late administration of acetylcysteine." Lancet 335(8705): 1572-1573.
22. Henne-Bruns, D., J. Artwohl, et al. (1988). "Acetaminophen-induced acute hepatic failure in pigs: controversial results to other animal models." Res.Exp.Med.(Berl) 188(6): 463-472.
23. Herrero, J. L., I. Castellano, et al. (2001). "Acute kidney failure caused by paracetamol poisoning." Nefrologia 21(6): 592-595.
24. Hinson, J. A., D. W. Roberts, et al. (2010). "Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis." Handb Exp Pharmacol(196): 369-405.
25. Ilonen, I., A. M. Koivusalo, et al. (2006). "Albumin dialysis has no clear effect on cytokine levels in patients with life-threatening liver insufficiency." Transplant Proc 38(10): 3540-3543.
26. Ilonen, I., A. M. Koivusalo, et al. (2008). "Cytokine profiles in acute liver failure treated with albumin dialysis." Artif Organs 32(1): 52-60.
27. Ishida Y, K. T., Kimura A, Tsuneyama K, Takayasu T, Mukaida M. (2006). "Opposite roles of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of acetaminophen-induced liver injury." Eur J Immunol 36: 1028 - 1038.
28. Isoniemi, H., A. M. Koivusalo, et al. (2005). "The effect of albumin dialysis on cytokine levels in acute liver failure and need for liver transplantation." Transplant Proc 37(2): 1088-1090.
29. Jaeschke, H. and T. Hasegawa (2006). "Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury." Liver Int 26: 912 - 919.

30. Jones, A. F. and J. A. Vale (1993). "Paracetamol poisoning and the kidney." J.Clin.Pharm.Ther. 18(1): 5-8.
31. Jones, A. F. and J. A. Vale (1993). "Paracetamol poisoning and the kidney." J Clin Pharm Ther 18(1): 5-8.
32. Junqueira, L. C., J. Carneiro, et al. (2002). "Histologie. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag."
33. Kaplowitz, N. (2005). "Idiosyncratic drug hepatotoxicity." Nat Rev Drug Discov 4(6): 489-499.
34. Katoonizadeh, A., F. Nevens, et al. (2006). "Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study." Liver Int 26(10): 1225-1233.
35. Koivusalo, A. M., T. Kantola, et al. (2009). "Is it possible to gain extra waiting time to liver transplantation in acute liver failure patients using albumin dialysis?" Ther Apher Dial 13(5): 413-418.
36. Koivusalo, A. M., A. Vakkuri, et al. (2005). "Experience of Mars therapy with and without transplantation in 101 patients with liver insufficiency." Transplant Proc 37(8): 3315-3317.
37. Lai, W. K., G. Haydon, et al. (2005). "The effect of molecular adsorbent recirculating system on pathophysiological parameters in patients with acute liver failure." Intensive Care Med 31(11): 1544-1549.
38. Laskin, D. L. (2009). "Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces." Chem Res Toxicol 22(8): 1376-1385.
39. Lee, J. Y., S. B. Kim, et al. (2010). "Comparison of the Molecular Adsorbent System and Plasmapheresis for Patients With Graft Dysfunction after Liver Transplantation." Transplantation Proceedings 42: 2625 - 2630.
40. Lee, V. M., R. G. Cameron, et al. (1998). "Zonal location of compensatory hepatocyte proliferation following chemically induced hepatotoxicity in rats and humans." Toxicol Pathol 26(5): 621-627.
41. Lee, W. M. (1994). "Acute liver failure." Am J Med 96(1A): 3-9.
42. Lee, W. M., L. S. Hynan, et al. (2009). "Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure." Gastroenterology 137(3): 856-864, 864 e851.
43. Markiewski, M. M., R. A. DeAngelis, et al. (2009). "The regulation of liver cell survival by complement." J Immunol 182(9): 5412-5418.
44. Mazer, M. and J. Perrone (2008). "Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management." J Med Toxicol. 4(1): 2-6.
45. Mehendale, H. M. (2005). "Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury." Toxicol Pathol 33(1): 41-51.

46. Mitchell, I., D. Bihari, et al. (1998). "Earlier identification of patients at risk from acetaminophen-induced acute liver failure." Crit Care Med 26(2): 279-284.0
47. Mitzner, S. R., J. Stange, et al. (2001). "Albumin dialysis using the molecular adsorbent recirculating system." Curr Opin Nephrol Hypertens 10(6): 777-783.
48. Mitzner, S. R., J. Stange, et al. (2001). "Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure." J Am Soc Nephrol 12 Suppl 17: S75-82.
49. Newsome, P. N., J. N. Plevris, et al. (2000). "Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation." Liver Transpl 6(1): 21-31.
50. Novelli, G., M. Rossi, et al. (2008). "Pediatric acute liver failure with molecular adsorbent recirculating system treatment." Transplant Proc 40(6): 1921-1924.
51. Novelli, G., M. Rossi, et al. (2002). "MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System): experience in 34 cases of acute liver failure." Liver 22 Suppl 2: 43-47.
52. O'Grady, J. G., S. W. Schalm, et al. (1993). "Acute liver failure: redefining the syndromes." Lancet 342 (8866): 273-275.
53. O'Grady JG, S. S., Williams R. (1993). "Acute liver failure: redefining the syndromes." Lancet 342 (8866): 273-275.
54. Pereira, S. P., P. G. Langley, et al. (1996). "The management of abnormalities of hemostasis in acute liver failure." Semin Liver Dis 16(4): 403-414.
55. Polson, J. and W. M. Lee (2005). "AASLD position paper: the management of acute liver failure." Hepatology 41(5): 1179-1197.
56. Quaglia, A., B. C. Portmann, et al. (2008). "Auxiliary Transplantation for Acute liver Failure: Histopathological Study of Native Liver Regeneration." Liver Transplantation 14: 1437 - 1448.
57. Ramaiah, S. K. and H. Jaeschke (2007). "Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury." Toxicol Pathol 35(6): 757-766.
58. Rey, C., N. Ajzenberg, et al. (1995). "Acute liver failure caused by paracetamol: should treatment with N-acetylcysteine be prolonged?" Arch Pediatr 2(7): 662-665.
59. Rifai, K. (2008). "Extracorporeal albumin dialysis." Hepatol Res 38(s1The 6 Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Liver Failure: Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September 2007, Iwate, Japan): S41-S45.

-
60. Saich, R., C. Selden, et al. (2007). "Characterization of pro-apoptotic effect of liver failure plasma on primary human hepatocytes and its modulation by molecular adsorbent recirculation system therapy." Artif Organs 31(9): 732-742.
 61. Saito, C., C. Zwingmann, et al. (2010). "Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine." Hepatology 51(1): 246-254.
 62. Salgia, A. D. and S. D. Kosnik (1999). "When acetaminophen use becomes toxic. Treating acute accidental and intentional overdose." Postgrad Med 105(4): 81-84, 87, 90.
 63. Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol 182(3): 311-322.
 64. Selzner, N., M. Selzner, et al. (2003). "ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice." Gastroenterology 124(3): 692-700.
 65. Stange, J., W. Ramlow, et al. (1993). "Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins." Artif Organs 17(9): 809-813.
 66. Strassburg, C. P. and M. P. Manns (2006). "Approaches to liver biopsy techniques--revisited." Semin Liver Dis 26(4): 318-327.
 67. Strey, C. W., M. Markiewski, et al. (2003). "The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration." J Exp Med 198(6): 913-923.
 68. Terblanche, J. and R. Hickman (1991). "Animal models of fulminant hepatic failure." Dig Dis Sci 36(6): 770-774.
 69. Theise, N. D., R. Saxena, et al. (1999). "The canals of Hering and hepatic stem cells in humans." Hepatology 30(6): 1425-1433.
 70. Thiel, C., K. Thiel, et al. (2011). "A reproducible porcine model of acute liver failure induced by intrajejunal acetaminophen administration." Eur Surg Res 46(3): 118-126.
 71. Thomson, R. K. and M. J. Arthur (1999). "Mechanism of liver cell damage and repair." Eur J Gastroenterol Hepatol 11: 949 - 955.
 72. Trey, C. (1972). "The fulminant hepatic failure surveillance study. Brief review of the effects of presumed etiology and age of survival." Can Med Assoc J 106: 525-528.
 73. Trey, C. and C. S. Davidson (1970). "The management of fulminant hepatic failure." Prog Liver Dis 3: 282-298.
 74. Wauters, J. and A. Wilmer (2011). "Albumin dialysis: current practice and future options." Liver Int 31 Suppl 3: 9-12.
 75. Werlich, T., K. J. Stiller, et al. (1999). "Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration." Exp Toxicol Pathol 51(1): 93-98.

-
76. Wigg, A. J. and R. T. Padbury (2005). "Liver support systems: promise and reality." J Gastroenterol Hepatol 20(12): 1807-1816.
 77. Williams, C. D., M. L. Bajt, et al. (2010). "Acetaminophen-induced hepatic neutrophil accumulation and inflammatory liver injury in CD18-deficient mice." Liver Int.: 1280 - 1292.
 78. Williams, C. D., A. Farhood, et al. (2010). "Role of caspase-1 and interleukin-1 β in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. ." Toxicol Appl Pharmacol. 247(3): 169 - 178.
 79. Wittebole, X. and P. Hantson (2011). "Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARS) for the management of acute poisoning with or without liver failure." Clin Toxicol (Phila) 49(9): 782-793.
 80. Wolf, H. K. and G. K. Michalopoulos (1992). "Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression." Hepatology 15(4): 707-713.
 81. Yang, R., K. Miki, et al. (2009). "Prolonged treatment with N-acetylcysteine delays liver recovery from acetaminophen hepatotoxicity." Crit Care 13(2): R55.
 82. Yin, L., D. Lynch, et al. (2002). "Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl₄/2-AAF injury." Histol Histopathol 17(1): 65-81.

Danksagung

An dieser Stelle gilt Herrn Professor Dr. A. Königsrainer mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Martin Schenk für die engagierte und lehrreiche Begleitung meiner Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Karolin Thiel und Herrn Dr. Christian Thiel für die tatkräftige Unterstützung und jederzeitige Hilfe während der Tierversuche und dem Verfassen der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Forschungsprojekts in der experimentellen Medizin für ihre freundschaftliche Unterstützung bedanken.