

Endotoxinämie im Akuten Leberversagen  
am Grosstiermodell

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Schiebel, Florian Magnus

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schenk  
2. Berichterstatter: Professor Dr. J.-S. Frick

Für meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1	Akutes Leberversagen und SIRS.....	8
1.2	Therapie .....	10
1.2.1	Biologische Verfahren.....	12
1.2.2	Artifizielle Verfahren.....	12
1.2.3	Bioartifizielle Verfahren (BAL).....	13
1.3	Leberersatzverfahren am Schweinemodell .....	14
1.4	Endotoxin (ET).....	15
1.4.1	Chemische Struktur .....	16
1.4.2	Endotoxinämie: Signalweg, Zytokine und Einflussgrößen .....	17
1.4.3	Endotoxinämie beim Versuchstier Schwein.....	19
1.5	Fragestellung.....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1	Grosstiermodell.....	21
2.1.1	Tiere .....	21
2.1.2	Tierschutz .....	21
2.1.3	Anästhesie .....	21
2.1.4	Operatives Vorgehen .....	23
2.1.5	Intra- und postoperatives intensivmedizinisches Management .....	23
2.1.6	Blutprodukte.....	25
2.2	Endotoxin (ET).....	27
2.2.1	Gewinnung der Untersuchungsmaterialien.....	27
2.2.2	Gewährleistung von Pyrogenfreiheit und Sterilität .....	28
2.2.3	Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Methode.....	28
2.2.4	Methodik der ET-Messung mittels LAL-Methode.....	29
2.3	Statistik .....	31
2.4	Studienplan und Behandlungsstrategien .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1	ALF .....	33
3.2	Überleben.....	33

<b>3.3</b>	<b>Klinik der Endotoxinämie und SIRS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4</b>	<b>Endotoxin.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Vergleich mit anderen Parametern.....</b>	<b>39</b>
3.5.1	IL-6.....	40
3.5.2	Laktat .....	41
3.5.3	Kalium .....	42
<b>3.6</b>	<b>Autopsie.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ALF	Acute Liver Failure, Akutes Leberversagen
BAL	Bioartificial Liver System, Bioartifizielle Leber
BGA	Blutgasanalyse
EK	Erythrozytenkonzentrat
ET	Endotoxin
FFP	Fresh frozen plasma, Plasmakonzentrat
HE	Hepatische Enzephalopathie
HF	Herzfrequenz
ICP	Intracranial pressure, Intrakranieller Druck
IL	Interleukin
i. m.	intramuskulär
ITN	Intubationsnarkose
i. v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
Limulus	Pfeilschwanzkrebs (Hufeisenkrebs, Limulus polyphemus)
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mean arterial pressure, Mittlerer arterieller Blutdruck
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome, Multiorgandysfunktionssyndrom
MOF	Multi organ failure, Multiorganversagen
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule [1 mmHg = 1 torr $\approx$ 0,133 kPa]
MW	Mittelwert
NAC	N-Acetylcystein
OLT	Orthotopic liver transplantation
P	Phosphat
PaCO <sub>2</sub>	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck

PEEP	Positive endexpiratory pressure, positiver endexpiratorischer Druck
SaO <sub>2</sub>	Arterielle Sauerstoffsättigung
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SDD	Selektive Darmdekontamination
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOD	Selektive oropharyngeale Dekontamination
Tab.	Tabelle
TIVA	Totale intravenöse Anästhesie
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
V.	Vena
ZVD	Zentralvenöser Druck

# 1 Einleitung

## 1.1 Akutes Leberversagen und SIRS

Das Akute Leberversagen (Acute Liver Failure, ALF) ist eine akut auftretende und dynamisch verlaufende Leberfunktionsstörung bei Patienten, die vorher keine chronische Lebererkrankung oder Leberfunktionsstörung hatten. Massgeblich ist das Vorliegen der Befundkonstellation von Koagulopathie (Synthesedysfunktion), Ikterus (exkretorische Dysfunktion) und Bewusstseinsstörung bei hepatischer Enzephalopathie (HE) (1). Kommt es zum Verlust einer kritischen Hepatozytenmasse, kann dies zum Ausfall der metabolischen Funktion der Leber und schließlich zu deren Zerfall führen (2). Das ALF kann im weiteren klinischen Verlauf rasch extrahepatische Komplikationen entwickeln, die ein Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) und als Endpunkt ein Multiorganversagen (Multi Organ Failure, MOF) auslösen können. Ein MODS/MOF ist charakterisiert durch eine fortschreitende Dysfunktion der lebenswichtigen Organe und Organsysteme (3). Die genaue Ätiologie des MOF ist aktuell nur in Einzelaspekten bekannt. Die Art und Ausprägung der auftretenden Komplikationen hängt neben der Dynamik von der Ätiologie des Leberversagens ab.

Die Ursachen für ein ALF variieren geographisch und differieren weltweit. In Deutschland sind die häufigsten Ursachen virale Hepatitiden und Medikamententoxizität. Seltener sind es Knollenblätterpilzvergiftungen, das Budd-Chiari-Syndrom und akute Manifestationen des M. Wilson (1). Auch ein primäres Transplantatversagen nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) kann im weiteren Sinne unter den Begriff ALF eingeschlossen werden.

Die Funktion und Perfusion der Leber im Rahmen von fortschreitenden MOF sind für den Verlauf und die Prognose von kritisch kranken Patienten von zentraler Bedeutung (4). O'Grady schlug eine Klassifikation des ALF vor, die durch das Intervall zwischen Auftreten eines Ikterus und der Enzephalopathie definiert ist. Liegt weniger als eine Woche zwischen den Ereignissen, spricht man von einem hyperakuten Verlauf. Vergehen eine bis vier Wochen, liegt ein akuter, nach vier oder mehr Wochen ein subakuter Verlauf vor (5).

Das ALF ist selten, in den entwickelten Ländern wird von einer Inzidenz von jährlich 1 – 6 Fällen pro einer Million Menschen ausgegangen (6). Für Deutschland gibt es Schätzungen von 100 – 150 Fällen und 40 – 60 Lebertransplantationen jährlich (1).

Das ALF kann eine lokal begrenzte Entzündungsreaktion auslösen, die für den Gesamtorganismus in erster Linie protektiv wirkt. Die ausgelöste Entzündungsreaktion kann jedoch durch verschiedene Faktoren bedingt auch auf andere Organsysteme übergreifen und dann eine systemische Entzündungsreaktion auslösen. Diese wird als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet und kann bis zum MOF führen (7). Neben der infektiösen muss aber auch von einer nichtinfektiösen Genese des SIRS ausgegangen werden, da bei klinischen Beobachtungen und Autopsien bei über 30% der Patienten mit Bakteriämie, die infolge eines MOF verstarben, kein septischer Fokus aufzufinden war (8). Auch im klinischen Alltag zeigen sich Verläufe, die in einem Multiorganversagen resultieren, nach primär nicht infektiösen Erkrankungen wie Trauma, schwerer akuter Pankreatitis oder nach grossen operativen Eingriffen (9, 10). Bone et al. beschreiben das SIRS als systemische inflammatorische Antwort auf eine Reihe von schwerwiegenden klinischen Auslösern wie Polytrauma, großen Operationen, schwere Verbrennungen und Pankreatitis, welche durch 2 oder mehr folgender Punkte gekennzeichnet ist: Fieber  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder Hypothermie  $< 36^{\circ}\text{C}$ , Tachykardie  $> 90/\text{min}$ , Tachypnoe  $> 20$  Atemzüge/min oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg) und eine Leukozytose  $> 12000/\text{mm}^3$  oder  $< 4000/\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife neutrophile Granulozyten (11). Sepsis gilt als SIRS ausgelöst durch einen Infektfokus (3).

Kennzeichen eines septischen Syndroms sind neben den Kennzeichen für ein SIRS die klinischen Anzeichen auf einen Infektfokus und eine inadäquate Organperfusion oder -dysfunktion. Zudem manifestiert sich mindestens eines der folgenden Zeichen: Minderung der Zerebralfunktion, Hypoxämie, erhöhtes Plasmalaktat oder Oligurie (12).

Das ALF kann neben systemischen Reaktionen wie SIRS und Sepsis, hypotonen und hyperdynamen Kreislauf und allgemeiner Katabolie zu folgender Reihe

von Komplikationen führen: (ad)renale und pulmonale Insuffizienz (hepatorenales Syndrom, Adult Respiratory Distress Syndrome, Hirnödem, intrakranielle Hypertension bis hin zum Koma (1, 13).

Die Leber ist eine Hauptquelle von Komplementfaktoren (Opsoninen), die sich an Fremdstoffe anlagern und zur Phagozytose beitragen. Ihr Mangel führt zur Prädisposition für Infekte (14, 15). Die häufigsten bakteriellen Infekte bei Patienten mit einer vorbestehenden Leberpathologie stellen die spontane bakterielle Peritonitis (SBP), Harnwegsinfekte, Atemwegsinfekte, biliäre und gastrointestinale Infekte und schliesslich Weichteilinfekte dar (16).

Infekte stellen beim ALF die zweithäufigste Todesursache dar. Bei 80% der Patienten können bakterielle Infekte nachgewiesen werden. Es finden sich meist pulmonale Infektfoci (ca. 50%), des weiteren solitäre Bakteriämien, Harnwegsinfekte und Besiedelungen von eingebrachten Fremdmaterialien (17). Die Infektionen treten dabei bereits früh im Verlauf des ALF auf, durchschnittlich 2 – 5 Tage nach Hospitalisation, und sind mindestens in 25% der Fälle verantwortlich für einen letalen Ausgang. Kommt es bei einem ALF zur einem SIRS, so trägt dies zur Verschlechterung der Morbidität und Mortalität bei, MODS und Sepsis können folgen (18).

Die Prognose des ALF richtet sich vor allem nach dem Auftreten und den Grad der HE bei vorhandener schwerer Leberfunktionsstörung, daneben der Ätiologie, dem Alter des Patienten und der Dynamik. Bei akuter Verlaufsform besteht im Vergleich zur subakuten Form eine bessere Prognose (19).

## **1.2 Therapie**

Bei einem ALF und während der Therapie eines SIRS sind ein intensives und engmaschiges Monitoring angezeigt. Im Vordergrund der Behandlung stehen allgemeine, in der Regel intensivmedizinische Massnahmen und die Prophylaxe von Komplikationen. Bei deren Eintreten ist eine frühzeitige und aggressive Therapie durch intensiviertes Flüssigkeitsregimes, gezielte antibiotische Therapie und frühzeitigen Einsatz von Vasopressoren angezeigt. Insgesamt haben die Fortschritte in der Intensivmedizin zu einer guten Verbesserung des Überlebens ohne Transplantation geführt (20). Für einige Ätiologien sind spezifische

Therapiemassnahmen möglich. Hierzu gehört der hochdosierte Einsatz von N-Acetylcystein (NAC) bei der Paracetamolintoxikation (21, 22).

Die Therapie des ALF beinhaltet darüber hinaus die extrahepatischen Komplikationen: Um der Katabolie entgegenzuwirken, besteht die Notwendigkeit zur Ernährungstherapie (parenteral/enteral) sowie der Zufuhr von Glukose, Fetten, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen. Neben der Nährstoffzufuhr sollte auch ein metabolisches Monitoring erfolgen mit regelmässiger Bestimmung der Elektrolyte und des Blutzuckers, sowie der Kontrolle der Laktat-, Ammoniak- und Triglyzeridwerte (2, 19). Es gibt Empfehlungen für eine Substitutionsbehandlung zur Normalisierung der Gerinnung bei zumeist mässig ausgeprägter Verbrauchskoagulopathie (23), zur konsequenten Säuresuppression zur Prävention oberer gastrointestinaler Blutungen (24) und zur Durchführung einer konservativen Hirndrucktherapie (2). Aufgrund der Datenlage sollte bei allen Patienten im ALF zudem eine prophylaktische antibiotische und antimykotische Behandlung durchgeführt werden. Die orale und enterale Gabe schwer oder nichtresorbierbarer Antibiotika und Antimykotika in Kombination mit einer initialen systemischen Antibiotikagabe im Sinne einer selektiven Darm- und oropharyngealen Dekontamination kann bei kritisch kranken Patienten die Mortalität senken (17, 25-28).

Zusammenfassend gelten folgende Empfehlungen der American Association for the Study of Liver Diseases: 1.) Aufnahme und engmaschige Überwachung von Patienten mit ALF vorzugsweise auf der Intensivstation; 2.) Frühzeitiger Kontakt zu einem Transplantationszentrum; 3.) Weiteres Management abhängig von der Genese (29). Die amerikanische ALF Study Group veröffentlichte Zahlen für das Jahr 2008, dass Patienten im ALF in 45% der Fälle ohne OLT spontan regenerierten, 25% transplantiert wurden und 30% verstarben (4).

Nach Ausschöpfen konventioneller Therapiemethoden und infauster Spontanprognose gilt beim ALF die rechtzeitige orthotope Lebertransplantation (OLT) als Methode der Wahl (30, 31). Die Überlebensraten aller wegen eines ALF transplantierten Altersstufen nach 1 und 5 Jahren postoperativ betragen 61% und 55% (20).

Temporäre Leberersatz- und -unterstützungsverfahren (Abb. 1) stellen aktuell noch keinen etablierten Therapiestandard dar. Die Grundidee dieser temporären Modelle ist der Zeitgewinn, um die kritische Phase des Versagens zu überwinden (Stabilisierung der Vitalfunktionen und Behandlung der Komplikationen) und um die Zeit bis zur Verfügbarkeit eines Organs zur Transplantation oder im Idealfall bis zur Regeneration und restitutio ad integrum der erkrankten Leber zu überbrücken (Bridging). Es lassen sich rein biologische von den rein maschinellen Verfahren unterscheiden und als Kombination beider die extrakorporalen Bioreaktoren auf der Basis von Hepatozyten (19).

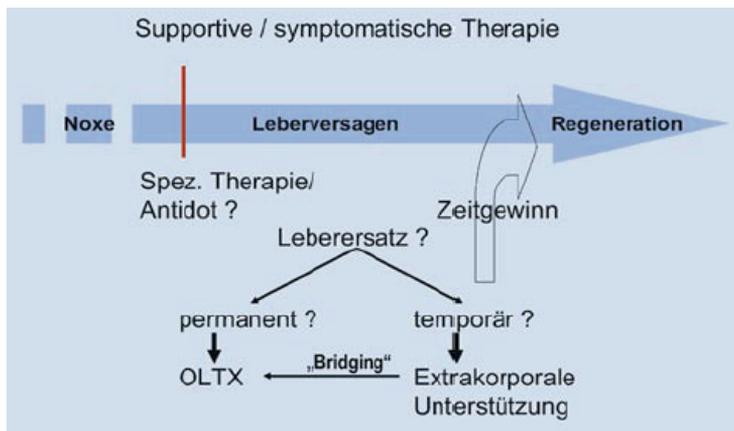


Abb. 1 Therapiekonzepte des akuten Leberversagens (2)

### 1.2.1 Biologische Verfahren

Rein biologische Methoden, wie die Hepatozytentransplantation (aus porciner oder humaner Quelle) oder die extrakorporale Perfusion einer kompletten Leber, die auch metabolische Funktionen übernimmt, konnten sich klinisch bisher nicht durchsetzen (32, 33).

### 1.2.2 Artifizielle Verfahren

Hinter den rein maschinellen, artifiziiellen Verfahren stehen als therapeutische Idee die Unterstützung oder der Ersatz der hepatischen Detoxifikation und die Sicherung der Homöostase im Sinne einer filtrierenden „Leberdialyse“. Die Syn-

thesefunktion der Leber wird nicht kompensiert. Konventionelle nephrologische Methoden wie Hämodialyse, Plasmapherese, Austauschtransfusion, oder Hämodisorption mit Aktivkohle führten zu einzelnen biochemischen und klinischen Effekten, eine Verbesserung der Mortalität zeigte sich nicht. Auch die Kombination verschiedener Verfahren ergab keine signifikanten Vorteile (19, 30, 34, 35). Die Datenlage zeigt sich aktuell insuffizient, um grundsätzliche Empfehlungen auszusprechen. Angesichts multipler Faktoren wie hohe Therapiekosten, der Komplexität und Schwierigkeiten der Gewinnung und Konservierung der differenzierten Hepatozyten hat sich die routinemässige Anwendung in der Klinik bislang nicht durchgesetzt (19, 30).

### **1.2.3 Bioartifizielle Verfahren (BAL)**

Das Therapiekonzept der bioartifiziellen oder hybriden Verfahren ist, im Sinne von extrakorporalen „Bioreaktoren“ eine quantitativ ausreichende funktionelle Leberzellmasse bereitzustellen, um die gesamte Leberfunktion zumindest vorübergehend zu ersetzen. Mithilfe einer speziellen Matrix werden hierbei Hepatozytenkulturen unterschiedlicher Herkunft (allogen, xenogen, Zellkulturreihen) in einem Bioreaktor gehalten. Bis dato zeigten sich in experimentellen Studien vitale, funktionstüchtige und kompatible Systeme mit einer gewissen Detoxifikationsfunktion, die Übertragung in den klinischen (Notfall-)Einsatz gelang jedoch nur partiell. Die vorliegende Datenlage beschreibt bislang auch hier keinen vollständigen Ersatz der hepatischen Synthesefunktion. Aktuell sind eine Fülle verschiedener Systeme auch in klinischen Studien auf dem Markt und in Probe und gewinnen zunehmend an Bedeutung. Gegenwärtig kann eine abschliessende Beurteilung bezüglich der verbesserten Überlebenszeit, Komplexität und der Kosten nicht durchgeführt werden und keine Therapie als Methode der Wahl für Patienten im ALF oder als Bridgingtherapie empfohlen werden (19, 36-38).

Aktuelle Review-Analysen, welche die Effekte und Bedeutung unterschiedlicher extrakorporaler Verfahren untersucht haben, kommen zu dem Resultat, dass durch den Einsatz extrakorporaler Leberersatzverfahren die Mortalität des akuten-chronischen Leberversagens reduziert werden kann, sich aber beim akuten Leberversagen keine Reduktion der Mortalität zeigt. Zudem herrscht kein Kon-

sens über den Zeitpunkt des Therapiebeginns, die Häufigkeit, Dauer und „Dosis“ des Leberersatzverfahrens (39, 40).

### **1.3 Leberersatzverfahren am Schweinemodell**

Die Schwierigkeit der klinischen Entwicklung von bioartifiziellen Leberersatzverfahren ergibt sich unter anderem auch durch das Fehlen eines optimalen Tiermodells. In der Vergangenheit wurden zur Simulation eines ALF im Tierversuch verschiedene Modelle diskutiert, bislang konnten jedoch nur Teilaspekte des komplexen Zusammenhanges simuliert werden (41-43).

Es gibt derzeit folgende drei Ansätze, ein ALF im Tierversuch zu simulieren: Die medikamentös-toxische Intervention mit Applikation hepatotoxischer Substanzen wie beispielsweise Paracetamol (Acetaminophen) (44), Amatoxin (45) oder Galactosamin (46). Die Schwierigkeit jeweils bleibt die Reproduzierbarkeit und das unterschiedliche Ausmass des ALF, welche durch Faktoren wie Dosis, Applikationsart, Enzyminduktion und -inhibition entstehen (42).

Die nächste Methode zur Simulation des ALF ist die chirurgische Intervention, im Sinne einer Devaskularisation (47), partiellen Hepatektomie (48), totalen Hepatektomie (49) oder Ischämie-Modellen (50). Bleibt perfundierte Leber in situ, ist das Modell nicht anhepatisch und es besteht eine Restfunktion. Ist nicht perfundierte Leber in situ, kann es zu einem individuell sehr unterschiedlichen toxischen Lebersyndrom kommen, was erneut die Reproduzierbarkeit des Modells einschränkt, jedoch eher dem Pathomechanismus des ALF entspricht. Dahingegen ist die totale Resektion gut reproduzierbar und zweckmässig, ein effizientes Leberersatzverfahren in Abwesenheit einer funktionierenden Leber zu untersuchen (42, 51).

Schliesslich wird die Applikation eines infektiösen Agens beschrieben. Aufgrund der Kosten, der schwierigen Verfügbarkeit des Agens, der meist unpraktikabel grossen Zeitspanne zwischen Applikation und Einsetzen des Lebersversagens sowie der stärkeren Gefährdung des beteiligten Personals besitzt es einen geringen Stellenwert (41, 42).

Sechs allgemein anerkannte Anforderungen an ein erfolgreiches Tiermodell zur Therapie des ALF wurden von Terblanche und Hickman aufgestellt (52): 1) Reversibilität: Ein Lebersversagen soll durch gezielte Therapieansätze umgekehrt

werden können, so dass das Tier überlebt; 2) Reproduzierbarkeit: Erreichen einer Standardisierung und eines definierten Endpunktes wie den Zeitpunkt des Exitus; 3) Tod als direkte Folge des Leberversagens; 4) Ein therapeutisches Fenster, das zeitlich ausreicht, um einen Zeitpunkt einer Pathologie zu erkennen, die Therapie zu beginnen und den Effekt zu beurteilen; 5) Ein Grosstiermodell als relatives Kriterium für ein mess- und standardisierbares Monitoring für ein adäquateres späteres Übertragen auf den Menschen; 6) Gefahrenminimierung für das beteiligte Personal. Als 7. Kriterium forderten Fourneau et al. bewusstseinswache, nicht sedierte Tiere, um das Auftreten einer HE als Kriterium des ALF zu erfassen (50).

#### **1.4 Endotoxin (ET)**

Endotoxin, ein Lipopolysaccharid (LPS), stellt eine wesentliche Strukturkomponente der äusseren Membran der Zellwand von Gram-negativen Bakterien dar, welche in der Natur ubiquitär vorhanden sind. Üblicherweise wird es via Inhalation aufgenommen, bei Tieren kann dies zu großem Anteil auch über das Futter erfolgen (53). ET wird erst bei der Bakteriolyse freigesetzt und damit biologisch wirksam (54). Unter bestimmten Wachstumsbedingungen können größere Mengen an ET durch den Vorgang des „shedding“ auch von lebenden Organismen freigesetzt werden (55). Die Begriffe LPS, ET und Pyrogen werden heute synonym verwendet, wobei der Begriff „Pyrogen“ nur eine funktionelle Wirkung beschreibt.

Resorbierte Endotoxine entfalten meist keine biologische Wirksamkeit, da sie schnell inaktiviert werden. Dies wird beispielsweise erreicht durch Interaktion mit Plasmasubstanzen und dem Lipoprotein HDL (56). Ohne Inaktivierung zeigt sich die biologische Bedeutung der ET mehrschichtig: Einmal zeigen sich vorteilhafte Aspekte in der Interaktion mit dem Immunsystems eines Wirts. Beispielsweise wirken sie auf B-Lymphozyten immunmodulierend, mitoseauslösend und zur polyklonalen Antikörpersynthese befähigend (57). Auf der anderen Seite kann ET selbst in extrem niedriger Konzentration schwerwiegende biologische Effekte auf den Menschen und Säugetiere hervorrufen, wenn es in den Blutkreislauf eintritt. Ihm wird eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der gramnegativen Sepsis zugesprochen (58). Verschiedene Spezies reagieren

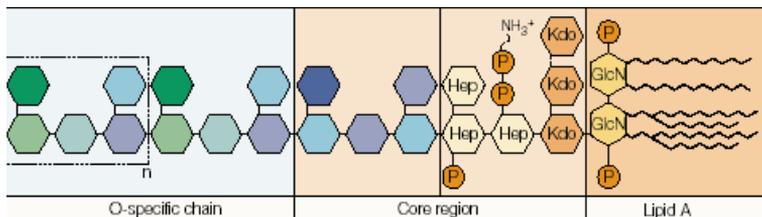
unterschiedlich auf ET. Der Mensch ist ungewöhnlich sensitiv und schon Kleinst Dosen können hämatologische Veränderungen herbeiführen (59). Laut Rietschel und Brade reicht eine ET-Konzentration von 10 µg/ml aus, um eine Monozytenreaktion beim Menschen zu initiieren (60).

Bei wiederholter Exposition mit ET wird in experimentellen Tiermodellen eine Toleranz beschrieben. ET induziert dabei qualitative und quantitative Veränderungen in der Monozytenfunktion und der Zytokinproduktion (61).

Physiologisch wird ET beim Menschen aus dem Gastrointestinaltrakt wahrscheinlich kontinuierlich in kleinen Mengen via Portalkreislauf zur Leber transportiert (62). Dort wird es hauptsächlich von den ortsständigen Kupfferzellen aus dem Blut entfernt (63), wahrscheinlich zu einem bestimmten Teil auch von Hepatozyten (64). Kommt es im Rahmen der Aufnahme von ET durch den Darm im Zuge der Immunantwort zu einem großen neutrophilen Zustrom, so kann dieser aufgrund reaktiver Sauerstoffmetabolite, Proteasen und anderer Enzyme der Granulozyten zu morphologischer und funktioneller Schädigung der gesunden Leber führen (65, 66). Ist die Leber andererseits bereits geschädigt, wie in der Zirrhose, kann dies zur systemischen Endotoxämie führen (67). Im Allgemeinen wird ET neben anderen metabolischen und hämodynamischen Ursachen als beeinflussender Faktor der Leberregeneration vermutet (68).

### 1.4.1 Chemische Struktur

Das ET-Molekül (Abb. 2) besteht aus einem zweiteiligen hydrophilen Polysaccharidteil und einem kovalent gebundenen hydrophoben Lipid A-Anteil. Alle Endotoxine sind Varianten desselben Moleküls.



**Abb. 2** Bau des ET (GlcN = D-Glucosamin ; Hep = L-Glycero-D-Manno-Heptose ; Kdo = 2-Keto-3-Deoxyoctonsäure; P = Phosphat) (54)

Der Polysaccharidteil besteht aus der O-spezifischen Seitenkette und dem ebenfalls zweigeteilten Kernbereich. Die Seitenkette ist stammsspezifisch und die variabelste Formation des ET. Sie repräsentiert die O-Antigene außerhalb der Zellwand und evoziert die spezifische Immunantwort. Das Oligosaccharid des Kerns (Core) ist wenig variabel. Der Kern besteht aus einem inneren und einem äußeren Kernbereich (Inner und Outer core), der innere ist mit dem Lipid A-Teil, der äußere mit der O-spezifischen Seitenkette verknüpft. Die unvariabelste Struktur des ET-Moleküls ist der Lipid A-Teil, wobei sich die Art, Länge und Substitution der Fettsäuren unterscheiden können. Die Länge dieser Fettsäuren kann variieren (10 bis 18 Kohlenstoffatome) und ist für jeden Bakterienstamm spezifisch. Je nach Struktur der Fettsäuren ergibt sich die biologische Aktivität des ET (54, 69).

#### **1.4.2 Endotoxinämie: Signalweg, Zytokine und Einflussgrößen**

ET ruft die Zellantwort nicht direkt hervor, sondern es wirkt hauptsächlich durch Aktivierung von zirkulierenden und ortständigen Makrophagen (z. B. nicht-parenchymale Kupfferzellen der unspezifischen Immunabwehr der Leber), die über eine intrazelluläre Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden die Genexpression von Zytokinen initiieren (70).

Dabei ist das ET an ein zirkulierendes Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) gebunden. Das LBP ist ein Akute-Phase-Protein aus dem Plasma, das sich an den Lipid A-Teil anlagert. Dieser LPS-LBP-Komplex dockt auf der Makrophagenoberfläche an den CD 14-Rezeptor (CD = Cluster of Differentiation) an, was den Makrophagen aktiviert und zum Sezernieren von Zytokinen, freien Sauerstoff-Radikalen plus Lipo- und Cyclooxygenaseprodukten der Arachidonsäure veranlasst. Auch die Toll-like-Rezeptoren TLR-2 und 4 sowie der Plasmafaktor Septin scheinen an der LPS-Zytokin-Interaktion beteiligt zu sein (18, 71, 72). Der LPS-LBP-Komplex kann zur gramnegativen Sepsis führen (70).

Die Zytokine erleichtern und vermitteln diverse zelluläre Vorgänge im Entzündungsprozess wie Phagozytose und das Töten der Mikroorganismen. Eine gesteigerte Konzentration eines Zytokins im Blut kann als Indikator der Entzündung dienen und den septischen Schock initiieren. Derartige Zytokine sind Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Tumornekrosefaktor Alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) und

Interleukin-8 (IL-8) (73). Die Ausschüttung von IL-6 findet im Rahmen der Akutphasereaktion statt und wird in der aktuellen Labordiagnostik zur Früherkennung des SIRS eingesetzt. Die Höhe des IL-6-Spiegels korreliert dabei mit der Schwere der Entzündung, dem Ausmass der Organdysfunktion und der Mortalität (70, 74).

Zytokine wie IL-4 und IL-10 scheinen auf der anderen Seite aber auch antiinflammatorisch zu wirken und führen zu einer Immunsuppression, was die Prognose einer Sepsis verschlechtern kann. Diese Immunsuppression wurde von Bone et al. als das „Compensatory anti-inflammatory response syndrome“ (CARS) bezeichnet (75). Der immunologische Gesamtmechanismus kann als bipolar angesehen werden: einmal die unkontrollierte Hyperinflammation mit systemischer Entzündungsreaktion und fulminantem Organversagen und dem gegenüber eine Immunparalyse, welche eine systemische Bakteriämie, Endotoxinämie und das Fortschreiten einer Infektion unterstützt (76, 77). Es gibt Hinweise auf einen massgeblichen Anteil der Endotoxinämie an dieser Immunparalyse bei Patienten mit Leberzirrhose. Dies geschieht wahrscheinlich durch IL-10 vermittelte Veränderungen der Monozytenfunktion durch Down-Regulierung der HLA-DR-Expression (16, 78).

Die Zytokinwirkung führt zur endothelialen Dysfunktion mit Perfusionsstörungen, die gemeinschaftlich mit der Gerinnungsaktivierung zu Gewebshypoxie führt (70, 79). Aktivierte neutrophile Granulozyten können zudem zytotoxische Sauerstoffradikale und Proteasen ausschütten. Wird letztendlich der Darm affiziert, kann es über die beschriebenen Mechanismen zu einer gesteigerten Translokation von Bakterien und deren Toxinen aus dem Darmlumen in das Pfortaderstromgebiet und in das Lymphsystem kommen. Diese wiederum können die inflammatorischen Reaktionen einleiten und es entsteht ein Teufelskreis. Es gibt Studien, die den Mechanismus der Translokation bei Tieren und beim Menschen aufzeigen (3, 80).

Die Funktion der Darmbarriere kann sich physiologisch verändern, hierbei spielt die Ernährung und die Art der Ernährung eine große Rolle. Holst wies bei gesunden Schweinen tageszeitliche Schwankungen der Endotoxinkonzentrationen im peripheren Blut nach, welche durch eine gesteigerte Absorption von

physiologisch vorhandenem ET aus dem Darm nach Nüchternphasen und Anstieg der intestinalen Permeabilität erklärbar war (81). Gonella et al. stellten fest, dass es durch totale parenterale Ernährung über fünf Tage ebenfalls zu einem zunehmenden ET-Transport durch das Darmepithel kommt (82). Umgekehrt zeigte sich bei früher enteraler Ernährung bei postoperativen Patienten bei Leberzirrhose Child B und C ein im Vergleich mit einer totalen parenteralen Ernährung positiver Einfluss auf die Darmbarriere, daneben auch auf die Stickstoffbilanz und einen Gewichtsverlust (83). Grundsätzlich kann auch Mangelernährung mit systemischer und portaler Endotoxinämie einhergehen (84).

Die genaue Funktion des Darms bzw. der Darmbarriere im Rahmen eines MODS und beginnenden MOF ist aktuell nicht vollständig geklärt. Dem Versagen der Darmbarriere wird jedoch in der Literatur zunehmend eine Schlüsselrolle in der multifaktoriellen Genese des MOF zugeschrieben (80). Die Permeabilität der Darmmukosa kann sich multifaktoriell bedingt ändern. Bei postoperativen oder schockierten Patienten nach Verbrennung, Polytrauma oder Sepsis kann es zu einer Perfusionsstörung der „letzten Wiese“ und zur ödematösen Schädigung der intestinalen Mukosabarriere kommen. Darauf kann eine bakterielle Translokation, eine SBP und ein Übertritt von Bakterien und deren Toxinen ins Pfortaderstromgebiet und das Lymphsystem erfolgen (16, 70). Es kann bis zur Nekrose des Darmes kommen (85). Fällt wie beim ALF ein Hauptfaktor der Abwehrmechanismen aus, kann die Endotoxinämie über die Immunparalyse beim SIRS die Abwehrlage weiter verschlechtern (78).

#### **1.4.3 Endotoxinämie beim Versuchstier Schwein**

Wenn man die ET-Effekte auf Körpertemperatur, zirkulierende Leukozyten und den Gastrointestinaltrakt in verschiedenen Spezies vergleicht, kann man folgendes Ranking mit abnehmender Sensitivität erstellen: Kaninchen, Pferd, Ziege, Hund, Rind, Schaf, Katze, Schwein und Huhn (86). Betrachtet man die Literatur, so zeigen sich folgende Effekte von ET auf Schweine: Experimentell zu Schweinefutter gefügtes ET führte zu Fieber und Appetitlosigkeit sowie laborchemisch zur gesteigerten Prostaglandin F<sub>2α</sub>-Metaboliten-Konzentration. Diese gelten als sensitive Marker des ET-Einflusses (87). Holst stellte fest, dass gesunde Schweine keine beständigen klinischen Symptome aufwiesen sowohl

nach kurzzeitiger enteraler oder inhalatorischer, als auch nach einer Kombination von oraler und inhalatorischer ET-Exposition. Die ET-Konzentration war in dieser Studie in der Luft und im Futter gleich der in der Stallhaltung evaluierten. Lediglich in einigen Fällen ließen sich leichte Temperaturanstiege feststellen, die dem ET-Futter zugeordnet werden konnten. Bei einer Gruppe, die ET i.v. appliziert bekam (Dosen von 0,1 µg/kg bis 1,0 µg/kg), kam es eine halbe Stunde nach Injektion zu Symptomen wie Fieber, Zittern und Erbrechen; in stärkerer Dosis mit stärkerer Klinik. Tiere, die über sechs Tage im Futter ET beigefügt bekamen, entwickelten eine schwächere Klinik, was auf eine erworbene ET-Toleranz hinweist. Laborchemisch zeigte sich ein Anstieg von Gallensäuren und Glutamatdehydrogenase (Cholestase und Leberschädigung) im Serum, 15-Ketodihydroprostaglandin F<sub>2</sub>α (ET-Marker) im Plasma und Leukozytopenie. Bei Kombination von oraler und vierstündiger inhalativer ET-Exposition wurde via bronchoalveolärer Lavage eine gesteigerte Zahl von neutrophilen Granulozyten aufgefunden, was auf einen leicht entzündlichen Vorgang hinweist (81).

## **1.5 Fragestellung**

Das von der lokalen Lebernekrose ausgehende systemische ALF legt mit seiner inflammatorischen Komponente eine substanzielle Rolle von Endotoxin nahe.

Die hier vorliegende Arbeit trägt dazu bei, die pathophysiologischen Prozesse besser zu verstehen und limitierende Faktoren der Überlebenszeit in diesem Modell des ALF unter intensivmedizinischen Bedingungen zu erkennen.

- Unterscheidet sich die Überlebenszeit der Tiere nach standardisierter kompletter Hepatektomie mit einer standardisierten postoperativen Intensivtherapie im Vergleich zu bisher publizierten Daten?
- Wie ist der zeitliche Verlauf der ET-Konzentrationen ab präoperativ in der darauf folgenden anhepatischen Phase in den diversen Therapieregimes?
- Wie ist der Zusammenhang der ET-Konzentration zur Klinik und zu anderen laborchemischen Parametern, die Marker für eine SIRS oder ein MOF darstellen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Grosstiermodell**

#### **2.1.1 Tiere**

Im Rahmen eines Großtierexperiments wurden zwanzig weibliche Schweine der Deutschen Landrasse mit einem Gewicht von 30 – 46 kg (mittleres Gewicht: 35 ± 4 kg) untersucht..

#### **2.1.2 Tierschutz**

Die Studie wurde über den Tierschutzbeauftragten der Universität Tübingen der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen gemeldet und unter AZ C11/02 genehmigt (§4 Abs.3 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998, BGBl. S. 1105). Sie erfolgte übereinstimmend mit den Europäischen Tierschutzrichtlinien und wurde von zwei Veterinärmedizinern konsiliarisch betreut.

#### **2.1.3 Anästhesie**

Die intramuskuläre Prämedikation erfolgte 1 h präoperativ mit Atropin-Sulfat 0.1%, Ketaminhydrochlorid, Azaperon und Diazepam durch den Veterinär (Medikamentendosen siehe Tabelle 1). Dem sedierten und spontan atmenden Tier wurden zur Narkoseeinleitung zwei 18 G-venöser periphere Katheter (Vasofix, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in zwei Ohrvenen bds. eingelegt. Durch einen wurde ein Cavafix© -zentralvenöser Katheter (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) platziert, um während der Präparation der Halsgefäße für einen arteriellen Zugang eine sichere Aufrechterhaltung der Narkose zu ermöglichen.

Nach Intubation mit einem Magilltubus mit Cuff in Grösse 8 Ch (Lo-Contour™ Magill, Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland) erfolgte im Operationssaal die totale intravenöse Anästhesie (TIVA) und die druckkontrollierte Beatmung mit einem Sauerstoff-Lachgasgemisch im Verhältnis 1:2 (Galileo Gold, Hamilton Medical AG, Schweiz). Zielwerte der Beatmung: Atemfrequenz 8 - 12 Atemzüge pro Minute, Tidalvolumen 6 – 10 ml/kg KG, inspiratorische Sauerstoffkonzen-

tration (FiO<sub>2</sub>) je nach arteriellem Sauerstoffpartialdruck, PEEP 4 - 20 mmHg. Die Beatmung wurde peri- und intraoperativ im Bedarfsfall mit Hilfe einer arteriellen Blutgasanalyse (BGA) variiert (ABL 720, Radiometer, Copenhagen). Erfasst wurden via BGA auch unter anderem die Serumelektrolyte, der Säure-Basen-Haushalt, die Blutgase, die Blutglukose und das Hämoglobin.

Die Narkose erfolgte in TIVA mit kontinuierlicher Infusion von Ketaminhydrochlorid, Fentanyl und Midazolam von dem Zeitpunkt des sicheren venösen Zuganges bis zum Exitus letalis. Muskelrelaxation mit Rocuronium-Bromid. Antibiotische Prophylaxe präoperativ mit 2 g Ceftriaxon. Platzieren einer Magensonde zur Drainage (Argyle™, Tyco Healthcare, Tullamore, Irland). Lagerung auf dem Operationstisch (Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland) mit Spezialaufbau (Eigenbau) in Rückenlage. Zur Therapie einer Hypothermie erfolgte die Applikation von Wärmebeuteln und –matten mit der Zielkörperkerntemperatur von ca. 38,0 – 38,5 °C (88).

Medikament	Dosis	Firma
<b>Prämedikation (i.m.)</b>		
Atropin-Sulfat 0.1%	0.05 mg/kg KG	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	7 mg/kg KG	Ketamin® 10%, Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland
Azaperon	10 mg/kg KG	Stresnil®, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Diazepam	1 mg/kg KG	Valium®, Hoffmann-La Roche AG, Wyhlen, Deutschland
<b>Muskelrelaxation (i.v.)</b>		
Rocuronium-Bromid	1,0 mg/kg KG als Repetitionsdosis	Esmeron®, Organon-Teknika Medizinische Produkte GmbH, Eppelheim, Deutschland
<b>TIVA peri-, intra- und postoperativ</b>		
Ketaminhydrochlorid	15 mg/kg KG/h	Ketamin® 10%, Parke-Davis GmbH, Berlin
Fentanyl	0,02 mg/kg KG/h	Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Midazolam	0,9 mg/kg KG/h	Dormicum®, Hoffmann-La Roche AG, Wyhlen
<b>Antibiotische Therapie</b>		
Ceftriaxon	1 x 2 mg /d	Rocephin®, Hoffmann-La Roche AG, Wyhlen

Tab. 1 Medikation, Teil 1

### **2.1.4 Operatives Vorgehen**

Nach 12 h Nüchternphase, antibiotischer Prophylaxe mit Ceftriaxon 2 g und unter TIVA erfolgte die Desinfektion und das sterile Abdecken. Präparation der Halsgefäße (Vv. jugulares und A. carotis interna) zur Installation eines zentralarteriellen und zentralvenösen Katheters (*Arteriell*: Leadercath, Vygon, Écouen, Frankreich; *Venös*: Multi-Lumen Central Venous Catheter, Arrow International, Reading, PA, USA) zur kontinuierlichen Überwachung, Narkose und Probenentnahme. Platzieren einer Hirndrucksonde (Camino® MPM-1 monitor, Integra Neurosciences, Plainsboro, N.J., USA).

Hiernach erfolgte nach medialer Laparotomie und Anlage eines Zystostomie (Gentle-Flow, Tyco Healthcare, Tullamore, Irland) zur Dauerableitung die Freipräparation der Leber und Ligatur der A. hepatica sowie des Ductus hepaticus communis. Hiernach Mobilisation der V. portae und der infrahepatischen V. cava zur Vorbereitung der Anastomose mit einer Y-Gefäßsprothese (Uni-Graft® K DV, ITV, Denkendorf, Deutschland). Eröffnung des linksseitigen Zwerchfells für die suprahepatische Anastomose. Anastomosen in End-zu-Seit-Technik, wodurch nur ca. 1/3 des jeweiligen Gefäßes ausgeklemmt werden musste und dadurch eine Schonung der Perfusion der Abdominalorgane, des MAP und des Myokards möglich war. Nach kompletter Anastomose Abklemmen der infrahepatischen V. cava, der V. portae und der suprahepatischen V. cava und Freigabe des Blutflusses über die interponierte Gefäßsprothese. Hiernach En-bloc-Resektion der Leber mit retrohepatischer Vena cava. Bei trockenen und dichten Verhältnissen erfolgte der Verschluss des Zwerchfells und der schichtweise Abdominalverschluss (49).

### **2.1.5 Intra- und postoperatives intensivmedizinisches Management**

Der intraoperative Blutverlust und Mangel an leberspezifischen Gerinnungsfaktoren wurde durch die Gabe von präoperativ vorbereiteten porcinen Erythrozytenkonzentraten (EK) und Fresh Frozen Plasma Einheiten (FFP) substituiert (siehe 2.1.6). Intraoperative Gabe von EKs je nach Blutverlust im Verhältnis 1:1. Zudem erfolgte die Volumenersatztherapie sowie die Elektrolytsubstitution mit Kochsalzlösung 0,9% und Hydroxyethylstärke 6% (Fabrikat und Zielwert siehe

Tabelle 2). Zur Sicherung der Diurese erfolgte die kontinuierliche Gabe von Furosemid, im Verlauf erfolgte bedarfsweise und nach Ausschluss eines Volumenmangels die Gabe von Noradrenalin.

Zeigten sich die Vitalparameter zwei Stunden postoperativ stabil, erfolgte der Transport der Tiere vom Operationssaal auf die Intensivstation zur weiteren Therapie. Die Tiere blieben weiterhin in TIVA und ITN, die Tiefe der Anästhesie wurde anhand der Respiration, Herzfrequenz, Pupillenreflexen und Schmerzstimuli bestimmt. Fortführen der druckkontrollierten Beatmung. Zielwerte: Atemfrequenz 15 - 30 Atemzüge/Minute, Tidalvolumen 6 – 12 ml/kg KG, Inspiratorischer Sauerstoffanteil 0,3 – 1,0, PEEP 4 - 20 mmHg. Die Beatmung wurde im Bedarfsfall und postoperativ stündlich mit Hilfe einer BGA angepasst.

Folgende Kenngrößen zur Beurteilung der anhepatischen Phase wurden neben den Laborparametern (siehe Kapitel 2.2.1) kontinuierlich aufgezeichnet: Intrakranieller Druck (ICP, mit cerebralem Sauerstoffpartialdruck), Elektrokardiogramm, Herzfrequenz (HF), arterieller Mitteldruck (MAP), zentraler Venendruck (ZVD), arterielle Sauerstoffsättigung (SaO<sub>2</sub>), Kerntemperatur (T).

Folgende Parameter wurden stündlich bestimmt und bedarfsweise angepasst: Beatmungsparameter, Monitoring der Intensivtherapie, Diurese und mittels BGA die Blutgase, der Säure-Basen-Haushalt, Hämoglobin, Laktat, Blutglukose und Serumelektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Anionenlücke). Zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Perfusionsdruckes erfolgte die Gabe von Noradrenalin in Kombination mit Kochsalzlösung 0,9%, Hydroxyethylstärke 6% und FFPs; Postoperative Gabe von mindestens 1 EK und 3 FFP in 8 Stunden. Ziel-Quickwert 50%. Grenzwert für die Gabe eines EK stellte ein Hämoglobinkonzentration  $\leq 6$  g/dl dar. Der Blutzuckerspiegel (BZ) wurde mit Glukose-20%-Lösung über 100 mg/dl gehalten. Applikation von Furosemid für das Erhalten einer guten postoperativen Diurese. Antibiotische Therapie mit 2 g Ceftriaxon täglich.

Der Tod des Tieres wurde durch ein Absinken des arteriellen Mitteldrucks unter 30 mmHg oder Herzstillstand bei maximaler Katecholamin- und Intensivtherapie definiert. Einzelne Tierkadaver wurden autopsiert unter anderem zur Überprüfung des Operationssitus und dabei insbesondere der Y-Prothese. Es wurden

exemplarisch Nieren und Gehirne zur histologischen Aufarbeitung entnommen (49, 88, 89).

Medikament	Zielwert
<b>Hämodynamik</b>	
Noradrenalin (maximal 30 µg/min; Arterenol®, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden)	MAP zwischen 60 und 70 mmHg
<b>Diurese</b>	
Furosemid (Lasix®, Ratiopharm, Ulm); Boli von 10 - 20 mg)	Diurese 20 – 80 ml/kg KG/d, maximal 1000 mg/d
<b>Infusionstherapie</b>	
Natriumchlorid 0,9% (B.Braun Melsungen AG)	ZVD 8 - 12 mmHg
Hydroxyethylstärke 6% (Haes-steril®, Fresenius, Bad Homburg)	ZVD 8 - 12 mmHg
EK und FFP (Eigene Herstellung; Schlachthöfe Rottenburg a. N./Gärtringen)	Kreuzprobe (Crossmatch); Gabe nach Bedarf und Blutgasanalyse; Intra-OP je nach Verlust im Verhältnis 1:1; Post-OP mind. 1 EK und 3 FFP/8 h; Ziel-Quickwert 50%; Hämoglobin ≤ 8 g/dl.
<b>Stoffwechsel</b>	
Glucose 20% 500 ml (B. Braun Melsungen AG)	BZ > 100 mg/dl

Tab. 2 Medikation, Teil 2

## 2.1.6 Blutprodukte

### 2.1.6.1 Methodik der Gewinnung des Vollbluts

Das Vollblut wurde größtenteils im Schlachthof Rottenburg a. N., in wenigen Ausnahmen im Schlachthof Gärtringen von nur einigen Sekunden zuvor gekeulten Schweinen entnommen. Der geschlossene, sterile und mit Nummer identifizierbare Dreifachbeutel (450 ml; Compoflex®, Biotrans, Dreieich, Deutschland) wurde mittels der endständigen 1,65 mm Kanüle durch einen Gummistopfen hindurch an den sterilen Plastiktrichter angeschlossen. Der Trichter und die Zuleitung wurden mit ca. 70 ml der im Beutel vorhandenen sterilen, pyrogenfreien

Stabilisatorlösung durch Tieferhalten gespült. Der Stabilisator war CPD (Citrat, Phosphat, Dextrose). Der sterile Auffangtrichter mit dem angeschlossenen Beutelsystem wurde nach Inzision der Halsgefäße des Schweins in den Blutstahl gehalten. Bis auf wenige Ausnahmen wurde pro Schwein eine Vollblutentnahme durchgeführt.

Der vollblutgefüllte Trichter kam in eine selbstentworfene und erschütterungsfrei aufgehängte Holzhalterung zum Befüllen des tiefliegenden Transfusionsbeutels. Nach Füllung des Beutels wurde die Zuleitung per Metallklemme abgetrennt, abgeschnitten und innerhalb kurzer Zeit weiterverarbeitet.

#### 2.1.6.2 Methodik der Herstellung der Blutprodukte

Die Spendertiere wurden auf AB0-Blutgruppenantigene getestet, um eine AB0-Unverträglichkeit auszuschließen. Das Erythrozytenkonzentrat (EK) und das Fresh frozen plasma (FFP) wurden aus dem Vollblutbeutel eines Schweins gewonnen. Das Plasma wurde von den anderen Blutkomponenten zuerst durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 2500 G und 25 °C separiert (Heraeus Cryofuge 5500i, Thermo Fisher Scientific Inc, Deutschland) und dann zur Trennung in einen Transferbeutel abgepresst. Erythrozyten wurden mit 100 ml SAG-Mannitol Additivlösung konserviert und bei 4°C maximal 7 Tage aufbewahrt. Das EK wurde bei 4 °C eingekühlt, das FFP schockgefroren und bei - 80 °C gelagert (88).

#### 2.1.6.3 Methodik der Anwendung der TBP

Das im Kühlschrank bei 4°C ± 2°C gekühlte EK und das im Eisschrank bei - 80° C gefrorene FFP wurde vor der Transfusion im Wasserbad langsam erwärmt, vorsichtig geschwenkt und gewogen. Jedes Konzentrat wurde vor der Transfusion einer optischen Qualitätsprüfung unterzogen, wobei vor allem auf die Unversehrtheit des Blutbeutels, Koagelbildung, Verfärbungen (als möglicher Ausdruck einer Verkeimung) und auf Hämolyse geachtet wurde. Auffällige EKs wurden nicht verwendet. Um eine Hämolyse auszuschließen, wurde eine Probe von einem Milliliter bei 5000 G für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Labofuge 300, Thermo Scientific Inc, Deutschland).

Ein unbedenkliches EK wurde dann mit präoperativ entnommenem Blut des Versuchstieres im Sinne einer Kreuzprobe (Crossmatch) gekreuzt. FFP und EK wurden an verschiedenen Zugängen infundiert, um eine Koagulation zu vermeiden. Die Transfusionsgeschwindigkeit wurde dem klinischen Zustand des Schweins angepasst, insbesondere bei Kreislauf- oder Niereninsuffizienz. Ein Konzentrat lief in ca. einer Stunde ein, mit Ausnahme von Massivtransfusionen bei massivem Blutverlust. Neben den Blutprodukten wurde der Verlust intravasaler Flüssigkeit durch Gabe von Hydroxyethylstärke 6% und Natriumchlorid 0,9% substituiert.

## **2.2 Endotoxin (ET)**

### **2.2.1 Gewinnung der Untersuchungsmaterialien**

Die Blutentnahme am Versuchstier zur Messung der ET-Konzentration erfolgte zusammen mit anderen laborchemischen Blutparametern wie Blutbild (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, INR, PTT), Kreatinin, Harnstoff, Gesamteiweiß, Albumin, Ammoniak, Gesamtbilirubin, GOT, GPT, LDH, CK und CK-MB nach einem festen Schema präoperativ, postoperativ und in der anhepatischen Phase dreimal täglich um 0:00 Uhr, 8:00 Uhr und 16:00 Uhr. Die letzte Blutentnahme erfolgte zum Todeszeitpunkt. Die Entnahme wurde präoperativ an einer Ohrvene, sonst an einem arteriellen Katheter in der Arteria carotis durchgeführt. Die ET-Konzentration wurde selbst bestimmt, sämtliche anderen Parameter wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen nach den Vorgaben der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie bestimmt. Die Blutentnahme zur ET-Bestimmung wurde mit einem sterilen pyrogenfreien Vakkumröhrchen (Fabrikate siehe Tabelle 4) durchgeführt, das danach 10 Minuten mit 3000 G und bei 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein Transferröhrchen verbracht (Biopur-grade reaction tube) und auf -80 °C eingefroren wurde.

## 2.2.2 Gewährleistung von Pyrogenfreiheit und Sterilität

Die Abnahme des Blutes am Schwein erfolgte nach vorheriger Desinfektion der Anschlüsse, bei der ET-Messung wurden nur sterile Komponenten sowie Einmal-Plastikmaterial verwendet. Die darauffolgenden experimentellen Schritte wurden im sterilen Luftstrom durchgeführt.

## 2.2.3 Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Methode

Die ET-Konzentration wurde mittels der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Methode in vitro bestimmt. Limulus-Amöbozyten-Lysat ist ein wässriger Extrakt von Amöbozyten, primitiven Blutzellen des Pfeilschwanzkrebse (Limulus polyphemus). ET aktiviert ein Pro-Enzym des LAL, welches trüb wird und unter geeigneten Umständen ein festes Gel bildet, das turbidimetrisch gemessen werden kann. Das aktivierte Enzym führt ferner in einem synthetischen chromogenen Substrat zu einer Abspaltung von para-Nitroanilin, dessen Aktivierung zu einem Farbumschlag zu Gelb führt. Dieser kann photometrisch kontinuierlich bei 405 nm gemessen werden (90).

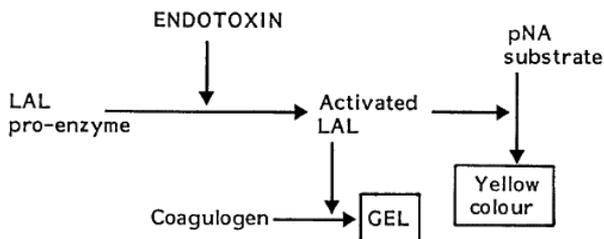


Abb. 3 Das Prinzip des LAL (90)

Bei der kinetisch-turbidimetrischen LAL-Methode wird einem bestimmten Volumen der Probe ein bestimmtes Volumen von LAL Endochrome-K zugefügt und die Reaktionsmischung bei 37°C inkubiert. Es wird dann die Steigerungsrate der Trübung oder die Zeitspanne (Anfangszeit = Onset time) bestimmt, die notwendig ist, um eine bestimmte Trübungsstufe zu erreichen. Die optische Dichte wird in regelmäßigen Abständen gemessen. Eine höhere ET-Konzentration ergibt eine kürzere Onset time.

Hiernach werden Standardkurven erstellt, indem die Log-Onset-time grafisch gegen die Log-Konzentration des Standard-ET aufgetragen wird. Anhand dieser Kurven werden die ET-Konzentrationen in den Proben berechnet. Die LAL-Methode ist schnell, spezifisch, leicht ausführbar und höchst empfindlich. Die Nachweisgrenze hängt von der verwendeten Methode und den verwendeten Instrumenten ab und kann einen Minimalwert von 5 pg/ml (0.6 Endotoxin Units/ml; 1 ng > 12 Endotoxin Units) erreichen. Eine Bestandteile von Pilzen können den Assay aktivieren, müssen jedoch in sehr hohen Konzentrationen vorliegen (90).

#### **2.2.4 Methodik der ET-Messung mittels LAL-Methode**

Die bei -80 °C gelagerten Schweineseren wurden ohne zusätzliche Erwärmung langsam auf Raumtemperatur gebracht und nach ihrer Verflüssigung zur Hitzeinaktivierung zehn Minuten in ein Wasserbad der Temperatur 80 °C gestellt. Nach dem definierten Abkühlen von einer Minute im Eisbad und einer dreiminütigen Behandlung in einem Ultraschallbad wurden die Proben in der Eppendorfcup-Zentrifuge bei 16.000 G und 4 °C sechzig Minuten zentrifugiert. Danach wurde zweimal 50 µl des Überstands der Proben auf eine Mikrotest-Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen als Doppelbestimmung pipettiert. Die äußere Vertiefungsreihe blieb allseitig leer. Neben den fünf Standards und einer Kontrolle mit sterilem pyrogenfreiem Wasser ergaben sich pro Platte 24 Proben. Die Standards entsprachen 1000, 100, 10, 1 und 0,1 pg Endotoxin/ml. Das LAL wurde gemäß den Herstellerangaben mit 3,2 ml sterilem pyrogenfreiem Wasser angesetzt. Nach dem Aufwärmen des Spektralphotometers auf 37 °C und dem Reaktionsstart durch Applizierung von 50 µl LAL in die Vertiefungen mit den Proben erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei 405 nm. Die Datenaufzeichnung erfolgte im Abstand von 150 Sekunden über 40 Durchgänge. Um eine Durchmischung zu gewährleisten, wurde jeweils im Anschluss an eine Messung die 96-Loch-Titerplatte mit niedriger Intensität zehn Sekunden geschüttelt. Es erfolgte ein Farbumschlag von serös durchsichtig nach gelb. Anschließend an die Messung wurden die Standardkurven berechnet und anhand dieser die ET-Konzentration der Proben ermittelt. Ausreißer in der Reihe der ET-Werte wurden durch Doppelbestimmungen verifiziert.

<b>Aparaturen und Geräte</b>	<b>Firma</b>
Gefrierschrank Hera freeze -80°C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Wärmebecken (80 °C) Typ 3047	Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Eisbad	Eigenbau
Ultraschallbad Transsonic T 310	Elma, Singen, Deutschland
Eppendorfcup-Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortex Mixer VF 2	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Wärmbares Photospektrometer (37°C) Reader HT 3	Anthos, Krefeld, Deutschland

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Firma</b>
Steriles pyrogenfreies Vakuumbloodabnahme- röhrchen	Endo Tube ET, Chromogenics AB, Moelndal, Sweden
Steriles pyrogenfreies Transferröhrchen bio- pur-grade reaction tube 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen ep T.I.P.S Singles 2-200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combitips plus 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterile Safe-Lock Tubes 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotest Zellkulturplatte; 96 Vertiefungen ( Microtest 96)	Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

<b>Detergenzien</b>	<b>Firma</b>
LAL Reagenz Wasser (LRW); steril und pyrogenfrei	Charles River Endosafe / Chromogenix, Italien
Kontroll Standard Endotoxin E. coli 055: B5 10 ng	Charles River Endosafe, Charleston, SC, USA
LAL (Limulus Amöbozyten Lysat) Endosafe® Endochrome-K™	Charles River Endosafe, Charleston, SC, USA

<b>IL-6-Messung</b>	<b>Firma</b>
FlowCytomix human TH1/Th2 10plex Kit II	Bender MedSystems, Wien Österreich

**Tab. 3** Materialien zur Bestimmung der ET- und IL-6-Konzentration

### 2.3 Statistik

Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm JMP (JMP™ Software 4.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) statistisch berechnet, die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Origin (Origin®, Version 7.0, OriginLab Corporation, MA, USA). Im Rahmen der Auswertung wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten Kategorien gebildet und Mittelwerte berechnet, die jeweils mit dem Standardfehler angegeben wurden ( $MW \pm SEM$ ). Bei den graphischen Darstellungen wurden ebenfalls die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern verwendet.

### 2.4 Studienplan und Behandlungsstrategien

Die Tiere wurden postoperativ nach vier Strategien behandelt, wobei jeder Therapieast aus einer Gruppe von fünf Schweinen bestand. Alle Tiere bekamen neben ihrer randomisiert zugewiesenen Therapie die gleiche maximale Intensivtherapie:

Die erste Gruppe (Kontrollgruppe) erhielt nach der Hepatektomie ausschließlich diese maximale Intensivtherapie. Die zweite Therapiegruppe erhielt additiv die Therapie mit einem Leberzellreaktor. Dieser bestand aus Modulen, in denen allogene, porcine kryokonservierte Hepatozyten auf Vliesen aus Polyurethan kultiviert wurden. Hierzu wurden Hepatozyten aus einer Schweineleber durch Collagenase-Pefusion isoliert und in die Module eingebracht. Die Module wurden mit einer kryoprotektiven Substanz versehen, einzeln verpackt und entlang eines definierten Gradienten in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Module aufgetaut, in den Reaktor eingefügt und zur Entfernung der kryoprotektiven Substanz gespült. Der Reaktor wurde an den Plasma-Strom einer Plasmapherese-Apparatur angeschlossen. Das Plasma wurde nach Passage durch den Reaktor wieder in das Tier infundiert. Die Therapie erfolgte ab 12 Stunden postoperativ für weitere 12 Stunden und in diesem Wechsel bis zum Exitus letalis des Versuchstieres. Des Weiteren erhielt die dritte Therapiegruppe zusätzlich zur Intensivtherapie eine temporäre Dialysebehandlung und die vierte Therapiegruppe eine temporäre Plasmapheresebehandlung in beschriebenen zwölfstündlichem Wechsel. Die Schweine der fünften Gruppe „Ausfälle“

bestanden die Eingangskriterien für die Aufnahme in die Studie beispielsweise durch Kreislaufstabilität nicht.

Gruppe	Behandlungsstrategie
1	Hepatektomie (Kontrolle) + Intensivmedizin
2	Leberersatz (Reaktor) + Intensivmedizin
3	Dialyse + Intensivmedizin
4	Plasmapherese + Intensivmedizin

**Tab. 4** Therapiegruppen der Studie



**Abb. 4** Leberzellreaktor der zweiten Therapiegruppe aus kryokonservierten Hepatozyten

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 ALF

Die Schweine wurden zur Induktion des ALF hepatektomiert. Die mittlere Operationszeit betrug  $181 \pm 24$  Minuten und der Blutverlust 300-700 ml. Dieser zeigte keine gruppenspezifischen Unterschiede und war hauptsächlich durch das in der Leber residuelle Blut bedingt.

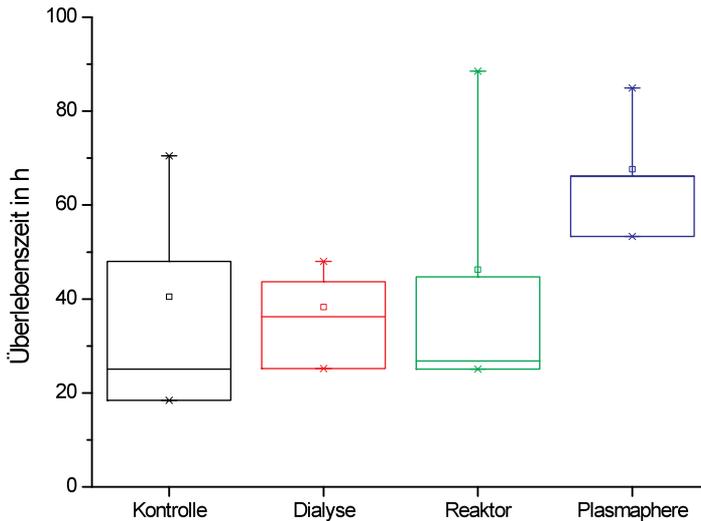
#### 3.2 Überleben

Die postoperative Überlebenszeit nach 18 Stunden betrug 100%. Die maximale Überlebenszeit betrug 85 h und die mittlere Überlebenszeit  $51 \pm 19$  h. Alle Tiere starben an MOF. Die durchschnittlichen Überlebenszeiten der Behandlungsstrategien Kontrolle, Dialyse und Reaktor befanden sich im gleichen Zeitraum von ungefähr 40 – 50 Stunden, die Plasmapheresegruppe zeigte das längste Überleben mit dem Mittelwert von 62,3 Stunden. Eine Auflistung der Überlebenszeiten mit den Variationsbreiten der einzelnen Gruppen zeigt Tabelle 5.

Gruppe	Behandlungsstrategie	Ø-Üz	Var.-Breite
1	Hepatektomie (Kontrolle)	41,2	18,4 – 70,5
2	Leberersatz (Reaktor)	49,5	25,1 – 85,0
3	Dialyse	45,0	25,2 – 72,2
4	Plasmapherese	62,3	41,2 – 84,9

**Tab. 5** Therapiegruppen der Studie mit durchschnittlicher Überlebenszeit in h (Ø-Üz = durchschnittliche Überlebenszeit; Var.-Breite = Variationsbreite)

In der folgenden Abbildung 5 sind die Überlebenszeiten der einzelnen Therapiegruppen mit den Standardfehlern für einen anschaulicheren Vergleich graphisch dargestellt.



**Abb. 5** Überlebenszeiten der Therapiegruppen in h (MW  $\pm$  SEM; Reihe geordnet von kürzer bis länger)

### 3.3 Klinik der Endotoxinämie und SIRS

Perioperativ zeigten sich stabile Vitalparameter. Parameter wie HF, MAP, ZVD, SaO<sub>2</sub> und ICP waren perioperativ und in den ersten 12 Stunden postoperativ stabil, im Verlauf verschlechterten sich diese in allen Gruppen in gleicher Weise und ohne signifikante Unterschiede. Auch die applizierte Flüssigkeitsmenge und der ZVD zeigten in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Beatmungsparameter verschlechterten sich im Verlauf zunehmend und ebenfalls ohne signifikante Unterschiede. Der Hirndruck zeigte sich postoperativ stabil und stieg im Verlauf und (prä-)final progredient an, ohne sich statistisch signifikant in den Therapiegruppen zu unterscheiden.

Die gemittelten Leukozytenwerte aller Gruppen zeigten postoperativ einen leichten Abfall, stiegen dann wieder etwas über den Ausgangswert und hielten sich im Verlauf stabil auf einem Plateau um 25000  $\mu$ l. Zum Exituszeitpunkt kam

es zu einem erneuten, nicht signifikanten Abfall auf  $10637 \pm 8125$  / $\mu$ l, wie bereits in einer anderen Dissertation dargestellt (91).

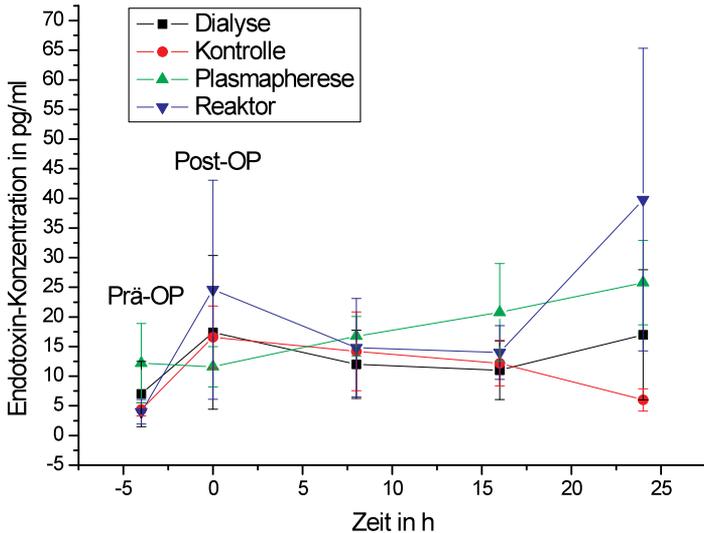
Grundsätzlich konnten bei den Versuchstieren keine beständigen klinischen Symptome ausgelöst durch Endotoxämie erfasst werden. Die Temperatur wurde durch verschiedene Maßnahmen nach ihrem intraoperativen Abfall auf Normaltemperatur gesteigert und bis zum Exitus möglichst konstant gehalten. Fieber bzw. ein signifikanter Temperaturanstieg oder Hypothermie konnten deshalb nicht ermittelt werden. Gelegentlich wurde ein leichter Tremor, eine gewisse Rigidität und Reaktionen auf venöse Punktionen bemerkt, was am ehesten mit der Narkosetiefe einherging. Appetitlosigkeit, Erbrechen und Anorexia konnte aufgrund der Vollnarkose nicht erfasst werden.

Eine Sepsis konnte nicht nachgewiesen werden, denn es zeigten sich klinisch keine Anzeichen für einen lokalisierbaren Infektfokus außerhalb der durch die Hepatektomie ausgelösten SIRS. Lokal zeigten sich die Laparotomiewunde sowie die Haut peripher der eingebrachten Fremdmaterialien reizfrei und unauffällig. Empirische Maßnahmen, wie eine röntgenologische Abklärung der Tierlungen fand ebenso wie eine Bakterienkultur des Urins ohne Verdacht auf Infekt nicht statt. Eine Minderung der Zerebralfunktion sowie ein Auftreten oder der Grad einer HE waren war am Tier in Vollnarkose nicht beurteilbar.

Zusammenfassend zeigten sich in diesem Modell die Merkmale eines ALF, das Auftreten eines SIRS und der Endpunkt im MODS/MOF. Die dazugehörigen kardiopulmonalen Veränderungen bedurften medikamentöser und apparativer Therapie.

### **3.4 Endotoxin**

Die Messung des Endotoxins erfolgte achtstündlich. Allgemein gesagt zeigten sich von präoperativ bis 16 Stunden präfinal planare und minimal schwankende Verläufe, so dass zunächst für die verschiedenen Therapiegruppen eine graphische Abbildung der ersten 24 h nach Operationsbeginn gewählt wurde:



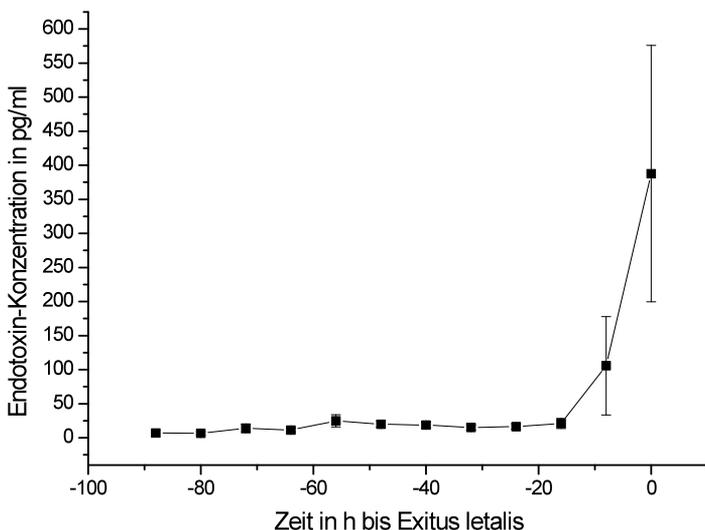
**Abb. 6** ET-Konzentration in der ersten 24 Stunden nach Beginn der Hepatektomie (MW $\pm$ SEM),

Die Anfangswerte zeigten sich bei allen Therapiegruppen niedrig. Der niedrigste gemittelte Ausgangswert wurde in der Reaktorgruppe mit  $4 \pm 2$  pg/ml gemessen, der höchste Ausgangswert zeigte sich mit  $12 \pm 7$  pg/ml in der Plasmapheresegruppe. Bereits postoperativ lagen, bis auf die Plasmapheresegruppe, nicht signifikant höhere Werte vor. Minimum bei der Plasmapheresegruppe mit  $12 \pm 3$  pg/ml, Maximum bei der Reaktorgruppe mit  $25 \pm 18$  pg/ml. Hiernach im Allgemeinen konstant niedriger Verlauf aller Therapiegruppen.

Nach 12 Stunden erfolgte der Beginn der zugelosten Therapieäste zusätzlich zur Intensivmedizin. Es zeigte sich bei allen Gruppen bis auf die Kontrollgruppe ein leichter Anstieg der ET-Konzentration bis zum nächsten Messpunkt nach 12 Stunden Therapie, welcher auch das Ende dieses Therapiezyklus darstellte. Den höchsten Wert verzeichnete die Reaktorgruppe mit  $40 \pm 26$  pg/ml, den zweithöchsten Anstieg die Plasmapheresegruppe mit  $26 \pm 7$  pg/ml und den

dritthöchsten Anstieg die Dialysegruppe mit  $17 \pm 11$  pg/ml. Zu einem weiteren Absinken kam es bei der Kontrollgruppe mit  $6 \pm 2$  pg/ml.

Um eine anschaulichere Vergleichbarkeit der Therapiegruppen mit den differierenden Überlebenszeiten zu erhalten, wurden die im Folgenden gemessenen Parameter zum Bezugspunkt des Exitus letalis graphisch dargestellt. Die gemittelte Endotoxinkonzentration der kumulierten Überlebenszeiten aller Gruppen zeigt Abbildung 7.

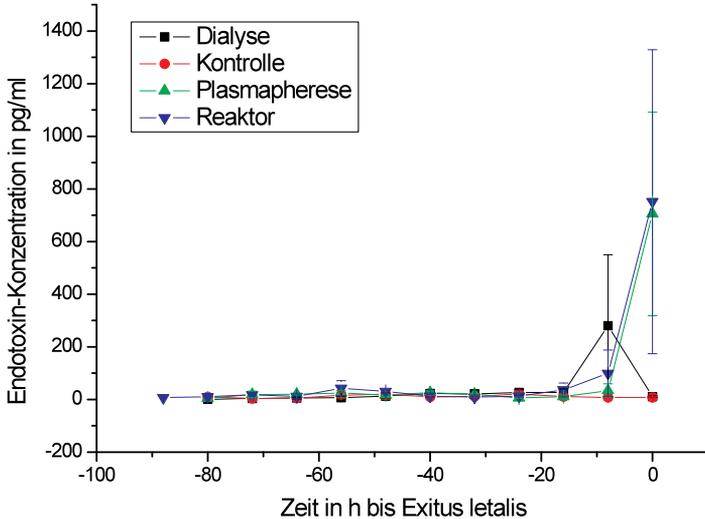


**Abb. 7** Gemittelte ET-Konzentration in den 24 h ante finem, [Werte in pg/ml]

Es zeigte sich hier generell bis zum Zeitpunkt 16 Stunden präfinal ein in allen Gruppen plateauartig flacher Verlauf, weshalb auf eine Aufteilung der verschiedenen Therapieäste verzichtet wurde. Erst ab der präfinalen 16-Stunden-Marke stieg die Endotoxinkonzentration im Mittel, wenngleich nicht signifikant, steil und deutlich an und zeigte einen entsprechend hohen Standardfehler. Die Absolutwerte zeigen das Minimum bei 80 Stunden vor Exitus mit  $7 \pm 2$  pg/ml, hiernach

Steigerung 16 Stunden präfinal auf  $106 \pm 72$  pg/ml auf den Exituswert und das Maximum  $388 \pm 188$  pg/ml.

Unterteilt man den Verlauf der ET-Konzentration in Bezug auf den Exitus letalis in die verschiedenen Therapieäste, ergab sich folgende Konstellation:



**Abb. 8** ET-Konzentration der einzelnen Therapiegruppen, Werte in [pg/ml]

Der bereits beschriebene präfinale mittlere Anstieg aller Gruppen, zeigte sich in der Einzeldarstellung auch in der Plasmapherese- und der Reaktorgruppe: Die Plasmapheresegruppe nahm für die Zeitpunkte 16 h präfinal, 8 h präfinal und zum Exitus die Werte  $10 \pm 3$  pg/ml,  $34 \pm 26$  pg/ml und  $705 \pm 387$  pg/ml, die Reaktorgruppe nahm für die Zeitpunkte 16 h präfinal, 8 h präfinal und zum Exitus die Werte  $37 \pm 26$  pg/ml,  $100 \pm 88$  pg/ml und  $752 \pm 577$  pg/ml ein.

Daneben zeigten sich folgende bemerkenswerte Tatsachen: In einigen Fällen und in der Kontrollgruppe komplett kam es zu plateauartig flachen Verläufen, welche auch (prä)final keine ansteigende Tendenz aufweisen. Die Kontrollgrup-

pe nahm mit konstanten Mittelwerten im Bereich von  $4 \pm 0$  pg/ml bis  $21 \pm 12$  pg/ml diese Art Sonderrolle ein. Die Dialysegruppe verhielt sich erneut abweichend von diesen beiden aufgezeigten Verläufen, stieg nach der präfinalen 16-Stunden-Marke von  $27 \pm 13$  pg/ml auf einen 8-Stunden-Wert von  $281 \pm 270$  pg/ml an, und sank dann wieder auf  $11 \pm 3$  pg/ml ab.

### **3.5 Vergleich mit anderen Parametern**

Vergleicht man den Endotoxinverlauf in den Gruppen mit den in Kapitel 2.1.5 beschriebenen Parametern, so lassen sich als Ergebnisse folgende Aussagen formulieren:

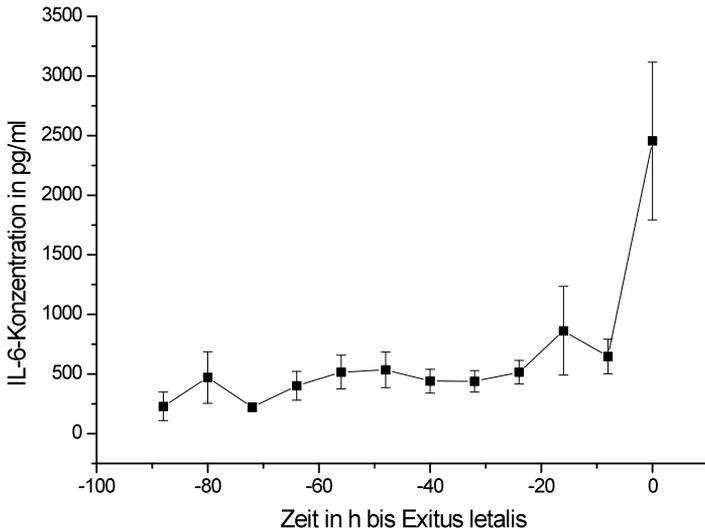
Bezugnehmend auf kardiopulmonale Werte, zeigten sich bei den im Verlauf undulierenden ET-Werten kein signifikant niedrigerer arterieller Mitteldruck und keine gesteigerte Herzfrequenz als bei niedrigen ET-Werten. Darüberhinaus erfolgte im Rahmen des (prä-)finalen Anstiegs der ET-Werte eine vasopressorische Therapie, weshalb sich gegenüber des MAP und der HF keine valide Aussage machen lässt. Dies gilt im gleichen Maß für die Beatmungsparameter, die sich im Verlauf nicht signifikant änderten und erst beim Auftreten des präfinalen SIRS/MOF-Komplexes kontinuierlich gesteigert werden mussten.

Hämatologisch zeigte sich bereits vor der (prä-)final hohen Endotoxinämie in den ersten 8 Stunden postoperativ eine signifikante Leukozytose, welche auf einem Plateau bis zum finalen Absinken stabil blieb (91). Die Thrombozytenzahl nahm ebenso wie der Quick-Wert als Gerinnungsparameter im Verlauf unter Substitution mit EK und FFP tendenziell und kontinuierlich ab.

Es fand sich ein anurisches Nierenversagen, d.h. eine kontinuierliche Abnahme der Ausscheidung, unabhängig von der ET-Konzentration.

Vergleicht man die Endotoxinkonzentrationen mit weiteren laborchemischen Werten, so zeigt sich keine Korrelation zu Ammoniak, welches stetig anstieg. Weitere Parameter bedürfen einer genaueren Betrachtung in den folgenden Kapiteln.

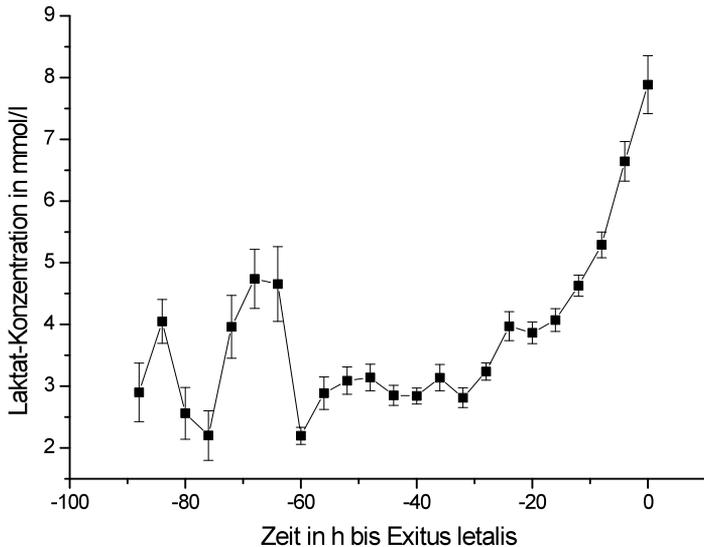
### 3.5.1 IL-6



**Abb. 9** Verlauf der gemittelten IL-6-Konzentration aller Studientiere, Werte in [pg/ml]

Präoperativ lagen mittlere IL-6-Ausgangswerte von  $81 \pm 91$  pg/ml vor, diese Werte sind nicht in dieser Grafik abgebildet (91). In dieser Abbildung konstanter Charakter der IL-6-Konzentrationen bis 16 h präfinal mit Werten von minimal  $222 \pm 35$  pg/ml zum Zeitpunkt 72 h präfinal, bis maximal  $536 \pm 149$  pg/ml zum Zeitpunkt 48 h ante finem. Anschliessend nicht signifikante Steigerung und Peak der Konzentration mit  $863 \pm 372$  pg/ml 16 h präfinal, dann leichter Rückgang auf  $647 \pm 144$  pg/ml und schliesslich finaler signifikanter Anstieg auf  $2455 \pm 662$  pg/ml.

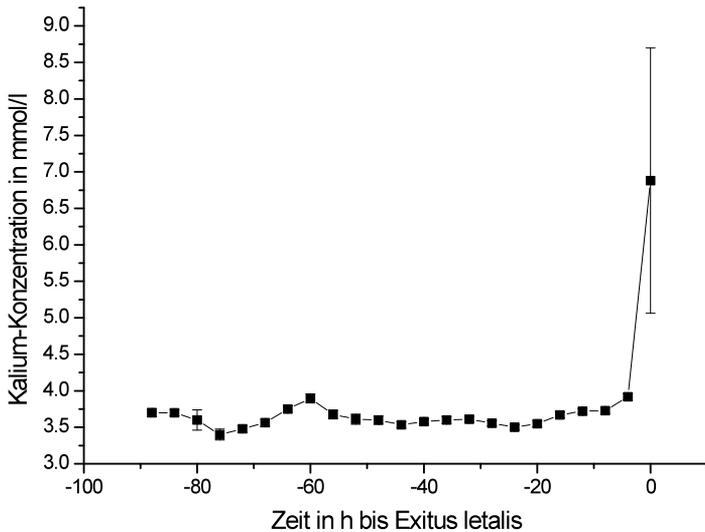
### 3.5.2 Laktat



**Abb. 10** Verlauf der gemittelten Laktat-Konzentration aller Studientiere, Werte in [mmol/l]

Der Laktatverlauf wurde erneut ausgehend vom Exitus letalis rückwärts abgebildet. Er nimmt einen virtuellen Startwert von  $2,9 \pm 0,5$  mmol/l ein, wobei dieser nur bei 3 Tieren 88 h vor Exitus bestimmt werden konnte. Bis zur 60. präfinalen Stunde undulierender Verlauf mit zwei Minima von  $2,2 \pm 0,4$  mmol/l (Stunde 76) und  $2,2 \pm 0,1$  mmol/l (Stunde 60) und einem Maximum von  $4,7 \pm 0,5$  mmol/l (Stunde 68). Hiernach Plateauphase bis ca. 28 Stunden präfinal mit Werten um 3,0 mmol/l, dann Beginn eines annähernd exponentiellen Verlaufs mit einem finalen Wert von  $7,9 \pm 0,5$  mmol/l.

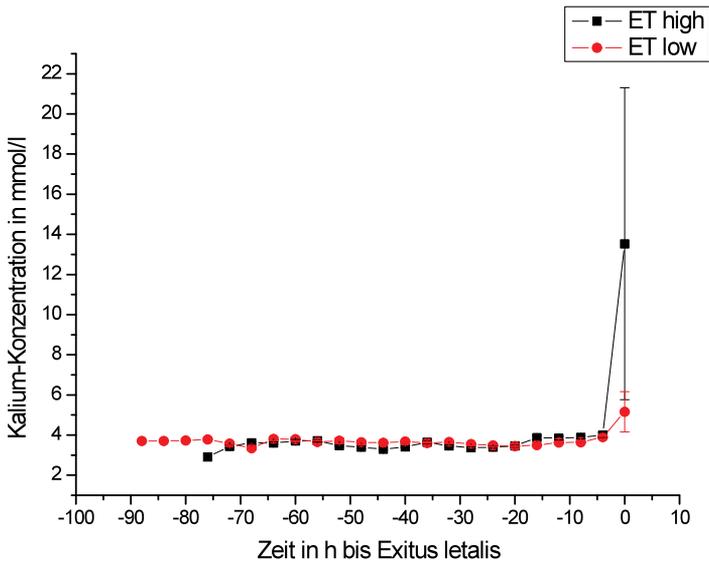
### 3.5.3 Kalium



**Abb. 11** Verlauf der gemittelten Kalium-Konzentration aller Studientiere, Werte in [mmol/l]

Der abgebildete Kalium-Konzentrationsverlauf wurde wiederum in Bezug auf den Exitus von rückwärts her abgebildet. Kalium nahm durchgehend mittlere Werte zwischen 3,4 und 3,9 mmol/l ein und bildet ein Plateau. Es ließen sich keine signifikanten Anstiege nachweisen, Peakbildung 60 h präfinal mit  $3,9 \pm 0,06$  mmol/l. Ante finem langsamer, kontinuierlicher Anstieg 16 h präfinal und besonders in den letzten 4 Stunden starker, nicht signifikanter Anstieg auf  $6,9 \pm 1,8$  mmol/l.

Unterteilt man die Versuchstiere unabhängig ihrer Therapiegruppenzugehörigkeit anhand der gemessenen maximalen Endotoxinkonzentrationen in zwei Teile mit dem Unterscheidungskriterium  $> 400$  pg/ml (ET high) und  $< 400$  pg/ml (ET low), so zeigte sich in Bezug auf die Kalium-Konzentration folgender Verlauf:



**Abb. 12** Kalium-Konzentration aller Therapiegruppen, welche in Endotoxinkonzentrationen > 400 pg/ml (ET high) und < 400 pg/ml (ET low) unterteilt sind, Werte in [mmol/l]

Nach der Plateauphase, die der im vorigen Schaubild entspricht, zeigt sich in der ET-high-Gruppe ein deutlicher finaler, aber nicht signifikanter Anstieg der Kaliumkonzentration von  $4,0 \pm 0,1$  mmol/l auf  $13,5 \pm 7,8$  mmol/l im Unterschied zur ET-low-Gruppe, bei der sich lediglich eine Steigerung von  $3,9 \pm 0,1$  mmol/l auf  $5,2 \pm 1,0$  mmol/l in den 4 präfinalen Stunden zeigt.

### 3.6 Autopsie

Hierbei zeigte sich intraabdominal in allen Fällen ein massiver Aszites von 2000 – 3000 ml. Ansonsten insbesondere im Operationsitus regelrechte Verhältnisse ohne Zeichen einer relevanten Nachblutung. Die Gefässtransplantate zeigten sich bei allen Tieren durchgängig und nach außen dicht. Die exemplarisch untersuchten Nieren zeigten sich ödematös und, teilweise mit durch venöse Verschlüsse bedingte, hämorrhagischen Infarzierungen. Die Histologie bestätigte

tubuläre Nekrosen. Cerebral zeigten sich geringradige hypoxische Veränderungen und keine ausgeprägten Ödemformationen.

## 4 Diskussion

Um die Rolle des ET beim Überleben im ALF zu beschreiben, wurde im Rahmen dieser Studie ein anhepatisches Tiermodell entwickelt. Zudem erfolgte die Verlaufsbeobachtung der ET-Konzentration in verschiedenen Therapiegruppen. Hierbei wurde ein bioartifizielles Leberersatzverfahren mit allogenen, porcinen Hepatozyten im Vergleich zu anderen Therapien angewendet. Dieses bioartifizielle System stellte eine Modellanordnung dar, um Erkenntnisse für zukünftige Projekte zu gewinnen. Das Leberersatzverfahren ist nicht direkt Gegenstand dieser Arbeit und wird deshalb nicht näher ausgeführt.

Alle gegenwärtigen Ansätze, ein ALF im Tierversuch zu simulieren, unterliegen Beschränkungen. Diese Ansätze schliessen medikamentös-toxische Interventionen, chirurgische Techniken und infektiöse Prozeduren ein (51). Unsere Großtierstudie zeigte folgende Merkmale: Zunächst wurden dem Menschen anatomisch ähnliche und robuste Tiere verwendet: die gastrointestinale Flora des Schweins ist ähnlich der menschlichen, zudem entspricht die vaskuläre Versorgung des Darmes annähernd der des Menschen (80). Es wurde ausserdem ein komplett anhepatisches Modell angewendet, in dem keine funktionierenden residuellen Leberanteile das Ergebnis beeinflussen konnten. Folglich entwickelte sich bei unserem Modell das individuell sehr unterschiedliche und toxische Syndrom nach ALF nicht. Zwar können auf diese Weise keine pathophysiologischen Produkte der Toxizität oder auch der Regeneration aus der insuffizienten Leber freigesetzt werden und die komplexen inflammatorischen Regelkreise auf zellulärer Ebene fallen weg, aber man erhält ein gutes Modell dafür, welche anderen Faktoren bei einem ALF limitierend sein können.

Es gelang bereits im Vorfeld dieser Studie im Rahmen einer Pilotstudie, ein operatives Prozedere zu etablieren, dass nach kompletter Hepatektomie und Überbrückung durch eine portokavale Anastomose einen Versuchsverlauf mit initial nahezu einwandfrei stabilen Vitalparametern des Versuchstieres darstellte (49). Diese standardisierte Technik erfüllte das von Terblanche geforderte Kriterium der guten Reproduzierbarkeit (52). Der Zeitpunkt der Hepatektomie markierte im Vergleich zu anderen Tiermodellen eindeutig den Beginn des ALF und

liess sich ebenso gut reproduzieren, wie das darauf folgende, standardisierte, intensivmedizinische Management, dass ein Überleben der hepatektomierten Tiere in diversen Therapiegruppen über mehrere Tage bewirkte. Dabei erfolgte ein umfangreicher intensivmedizinischer Ansatz, der sich an der humanen Therapie des ALF orientierte. Es gelang zudem das Etablieren einer aufwändigen, aber sehr sicheren und gut reproduzierbaren Methode zur Gewinnung von Blutprodukten, mit der es zu keinerlei nennenswerten Zwischenfällen kam.

Die nächste Anforderung von Terblanche an ein Tiermodell, die Reversibilität, zeigt sich nicht erfüllt. Diese stellt aufgrund der Komplexität der Hepatektomie eine Unmöglichkeit dar. Das Leberversagen kann hier nicht komplett umgekehrt werden und das Tier überlebt nicht. Bereits van de Kerkhove stellte sich diesbezüglich berechtigterweise aber die Frage, ob dieses Kriterium überhaupt als eine der wichtigsten Anforderungen anzusehen ist (41). Beim Eruiern der Leberersatzverfahren geht es in erster Linie um die Verbesserung des Überlebens im Sinne eines Bridging, sei es zur finalen Regeneration oder der OLT. Deshalb gilt primär nicht, Reversibilität zu garantieren, sie ist nur dann wichtig, wenn nur die Leberregeneration Anspruch des Verfahrens ist.

Bei unserem Modell gelang es hingegen weitgehend, die anderen von Terblanche geforderten Kriterien, die eine weitaus grössere Rolle spielen, zu erfüllen (52): Eintritt des Todes aufgrund eines MOF als Vollbild des ALF und eine lange Überlebenszeit, um ein optimales therapeutisches Fenster zu haben. Die Kehrseite der Verlängerung des anhepatischen Überlebens ist jedoch auch ein grösseres Zeitfenster für unerwünschte Nebeneffekte wie passagere Hypothermie oder septische Komplikationen, welche die Reproduzierbarkeit des Modells und das Überleben verändern können (88, 89). Ferner gewährleistete das Grosstiermodell die großzügige Entnahme von Blut- und Gewebeproben zur Evaluation und die Minimierung der Risiken für das beschäftigte Personal durch Verzicht auf infektiöse Noxen. Die Forderungen über die genügende Anzahl der Versuchstiere pro Therapiegruppe (fünf) zur Effizienztestung und Validität der Statistik und die genügende Zahl der Therapiegruppen (mindestens drei) wurden ebenfalls erfüllt.

In dieser Studie erfolgte der Beginn der Therapie bei stabilen kardiopulmonalen Verhältnissen ab 12 Stunden postoperativ in zwölfstündlichen Wechseln bis zum Exitus letalis. In den meisten anderen Studien wurde damit direkt nach dem Zeitpunkt der Induktion des ALF eingesetzt. Es können daher Überlegungen dahingehend gemacht werden, wann eine (B)AL-Behandlung in der anhepatischen Phase begonnen werden soll, um die klinische Situation von ALF-Patienten optimal abzubilden. Van de Kerkhove et al. empfehlen den Beginn erst nach Auftreten einer HE oder anderen Veränderungen wie des Anstiegs von Ammoniak oder Bilirubin (41).

Dem von Fourneau et al. geforderten Zusatzkriterium für bewusstseinswache, nicht sedierte Tiere, um ein Auftreten und den Grad einer HE zu erfassen (50), entsprachen wir aus ethischen und Tierschutzgründen nicht, daneben zeigte sich durch unser intensivmedizinisches Management die Aufzeichnung der Werte und Gewinnung der Proben problemlos. Ein Punkt, welcher an unserem Modell aus logistischen Gründen nicht gelang, aber durchaus denkbar ist, ist die Verwendung von autologen porcinen Hepatozyten in der BAL-Therapie dar. Damit würde jeweils nur ein Tier pro Experiment gebraucht werden.

Ein Parameter, welcher berücksichtigt wurde, war der des Geschlechts des Versuchstieres. Es gibt Angaben in der Literatur, dass bei dem Versuchstier Ratte die Resultate bei ALF-Modellen verschiedengeschlechtlicher Untersuchungsgruppen aufgrund der männlichen und weiblichen Geschlechtshormone voneinander abwichen und ferner in Gegensatz gestanden seien (92). Ob diese Unterschiede allerdings auch für Schweine gelten, ist nicht gesichert (41).

Zusammenfassend stellt dieses anhepatische porcine Modell eine geeignete Methode dar, Funktionalität und Sicherheit von Leberersatzverfahren zu prüfen. Es bleibt zudem festzustellen, dass Terblanche et al. gute Kriterien für die Beurteilung und Etablierung eines Leberersatzverfahrens liefern, aber weitere Faktoren einbezogen werden müssen.

Die Literatur zeigt eine Vielzahl von durchgeführten porcinen Studien zur Simulation eines ALF, teils durch Hepatektomie. Hierbei wurden teilweise Leberersatzverfahren angewendet, welche zu sehr differierenden Überlebenszeiten von durchschnittlich 10 bis 65 Stunden geführt haben (91, 93-102). Eine konsequent

an den humanen Standard angepasste intra- und postoperative Intensivtherapie erfolgte nur teilweise, in Einzelfällen erfolgte bis auf eine rudimentäre Infusionstherapie oder Ernährung keine weitere postoperative Therapie (103, 104). Die Studienansätze unterscheiden sich teilweise enorm von der heutigen klinischen Praxis, beispielsweise in der Durchführung einer Narkose, künstlichen Ventilation, Ausgleich von Glukose oder Elektrolyten oder der Gabe von Blutprodukten. Der Grund für diese intensivmedizinische Zurückhaltung wird meist nicht thematisiert. Das dann überwiegend angewandte Argument ist die Möglichkeit einer besseren Beurteilung der Leberersatzverfahren durch einen weitgehend unafektierten Verlauf des ALF (91). In dieser Studie wurde davon abweichend ein Ansatz gewählt, der besser der heutigen, humanen und intensivmedizinischen Praxis der Therapie eines Patienten im ALF entspricht. Auf diese Weise ist ganz abgesehen von Tierschutzgründen eine klinische Bewertung des Leberersatzverfahrens möglich.

Als Bilanz konnte im Vergleich zu den genannten Studien eine deutliche Verlängerung des mittleren Überlebens aufgezeigt werden, lediglich bei Sosef et al. zeigten sich bei einer postoperativen Basistherapie in der BAL-Gruppe ähnliche Überlebenszeiten (101). Die maximale Überlebenszeit nach standardisierter und kompletter Hepatektomie mit einer standardisierten postoperativen Intensivtherapie betrug unabhängig von dem bioartifiziellen Leberersatzverfahren ca. 85 h und die mittlere Überlebenszeit  $51 \pm 19$  Stunden, welche die bis dato veröffentlichten Überlebenszeiten übertreffen (49, 91). Damit konnte ein neuer Massstab im Vergleich zu anderen Methoden gesetzt werden (88).

An dieser Stelle gilt es zu erwähnen, dass auch im Rahmen dieser Studie aus verschiedenen Gründen nicht sämtliche in der Praxis bestehende Therapiemaßnahmen angewendet wurden. Teilweise deshalb, weil die erfassten und im Folgenden diskutierten Parameter dadurch wesentlich beeinflusst worden wären. Wenn diese Maßnahmen in Folgeprojekten eingeschlossen werden, könnten auf diese Weise weitere Risikofaktoren für ein SIRS/MOF eliminiert oder reduziert werden. Konkret gilt es, neben dem gramnegativen Spektrum auch grampositive Infektionen zu beleuchten, da diese für bis zur Hälfte der Fälle von schwerer Sepsis ursächlich sind. Des Weiteren muss bei längerer Überlebens-

zeit an Pilzinfektionen gedacht werden (76). Patienten und Studientiere könnten daher via selektiver Darmdekontamination (SDD) und selektiver oropharyngealer Dekontamination (SOD) behandelt werden, um die Mortalität zu senken und Informationen über den Risikofaktor ET zu erhalten (17, 25-28). Yao et al. konnten bei Ratten mit thermischen Verletzungen mittels einer SDD die Inzidenz einer Bakterien- und ET-Translokation sowie die Mortalität signifikant verbessern (105). Eine konsequente Säuresuppression zur Prävention oberer GI-Blutungen (24) kann ebenso wie eine konservative oder medikamentöse Hirndrucktherapie in Betracht gezogen werden (2). Ohne Vorliegen eines SIRS kann als weiterer Punkt bei Katabolie eine (par)enterale Ernährung mit Zufuhr von Glukose, Fetten, Albumin, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen evaluiert werden, da Mangelernährung mit einer systemischen und portalen Endotoxinämie einher gehen kann (83, 84).

Betrachtet man das Studienmodell im Hinblick auf die Klinik, so zeigten sich hier grundsätzlich die Merkmale eines ALF mit seinen systemischen Reaktionen wie SIRS und schliesslich dem MOF. Unter der antibiotischen Therapie mit Ceftriaxon 2 g i.v. täglich ergab sich klinisch kein Anhalt für eine Infektion. Empirische röntgenologische oder kulturelle Bestimmungen erfolgten deshalb nicht. Die Tatsache von fehlenden Infektoci geht mit der Beobachtung von Lee einher, dass sich eine Infektion beim ALF im Mittel nach 2 – 5 Tagen nach Hospitalisation manifestiert (106). Diese Zeitdauer liegt grob im Anschluss der Überlebenszeit in dieser Studie mit  $51 \pm 19$  Stunden. Ein Auftreten oder der Grad einer HE konnte aufgrund der Narkose, der problematischen Messbarkeit, der diesbezüglich relativ kurzen Überlebenszeit nach der Hepatektomie und der Spezies nicht nachgewiesen werden war. Einen Ersatz hierfür stellte die ICP-Messung mit cerebralem Sauerstoffpartialdruck dar, welche nicht Gegenstand dieser Arbeit ist.

Die von Holst beschriebene initiale Symptomatik auf inkorporiertes ET mit Fieber, Zittern und Erbrechen zeigte sich bei den klinisch gesunden Versuchstieren nicht. Leichte Temperaturanstiege könnten durch eher kühlere Temperatur während des präoperativen Transports maskiert worden sein. Auch besteht die Möglichkeit der erworbenen Toleranz der Tiere bei wiederholter ET-Exposition.

Da sich dieses Studien-Setting von denen bei Cort et al. und Holst unterscheidet, können deren Ergebnisse nicht bestätigt werden: Das ET wurde hier nicht zusätzlich verabreicht, die detoxifizierende Leber war nicht mehr vorhanden und die Tiere befanden sich darüber hinaus in ITN (81, 87).

Die von Tobias et al. beschriebenen laborchemischen Parameter, welche sich bei Endotoxinämie erhöht zeigen können, wie Gallensäuren im Serum (S-BA), Plasma 15-Ketodihydroprostaglandin F<sub>2α</sub> (P-PG), Serum-Glutamatdehydrogenase (S-GLDH) wurden ebenso wie das Lipopolysaccharidbindendes Protein (LBP) nicht erhoben (71). Demgegenüber stellen die hier evaluierten Grössen IL-6, Laktat und Kalium zeitgemässe Parameter dar, welche geeignet sind, verschiedene Aspekte der Endotoxinreaktion zu beschreiben. Grundsätzlich liess sich im Rahmen dieser Studie, welche ein ALF simuliert, das Auftreten einer Koagulopathie nachweisen. Steigende Bilirubinrubinwerte wiesen einen Ikterus (Exkretorische Dysfunktion) nach. Eine durchgehende Leukozytopenie zeigte sich nicht, die porcinen Leukozytenwerte zeigten vielmehr in den ersten 8 Stunden postoperativ eine signifikante Steigerung, welche dann auf einem Plateau bis zum finalen, nicht signifikanten Absinken stabil blieben. Sie entsprachen darüber hinaus den in der Literatur angegebenen Referenzwerten von 11000 – 22000/μl (107).

In Bezug auf das Versuchstier Schwein gibt es in der Literatur unterschiedliche, stark abweichende Angaben über natürliche Endotoxinkonzentrationen in Futter und Staub während der Stallhaltung. Sie betragen von wenigen μg/m<sup>3</sup> bis hin zu 20 mg/m<sup>3</sup> (53, 81). Wir gehen in unserer Studie von vergleichbaren Werten aus. Die Messung des Endotoxins erbrachte in dieser Studie präoperativ generell niedrige Werte zwischen 4 ± 2 und 12 ± 7 pg/ml, wie es bei gesunden Tieren zu erwarten ist. Bei einzelnen Tieren waren bereits die Ausgangswerte etwas erhöht. Dies könnte dem durch Holst berichteten Effekt entsprechen, dass sich nach einer Phase der Nahrungskarenz erhöhte Werte nachweisen lassen, welche durch eine gesteigerte Absorption von physiologisch vorhandenem ET aus dem Darm durch gesteigerte intestinale Permeabilität erklärbar ist (81). Die von uns erfassten ET-Konzentrationen lassen sich im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren insgesamt gut einordnen, bei Lumsden et al. lagen bei Patien-

ten mit Leberzirrhose periphere Endotoxinwerte von  $31 \pm 58$  pg/ml bis  $82 \pm 150$  pg/ml vor (67).

Betrachtet man die ET-Konzentrationen 12 Stunden nach Beginn der zugelassenen Therapien und präfinal, so zeigen sich folgende bemerkenswerte Tatsachen: Bleibt bei der Kontrollgruppe der ET-Wert bis zum Exitus letalis stabil und sinkt sogar postoperativ leicht ab, so steigt dieser in allen anderen Gruppen zu den Zeitpunkten 24 h postoperativ und ab 16 h präfinal an. Ist es postoperativ noch ein leichter Anstieg, so zeigt sich präfinal eine massive Steigerung. Diese Phänomene lassen sich gut mit dem Fakt erklären, dass sowohl bei der Dialyse, der Plasmapherese als auch dem Leberrektor extrakorporale Verfahren durchgeführt wurden, die durch externe Manipulation potentiell eine Minderung der Sterilität erfahren könnten. Die Kontrollgruppe hingegen erfuhr keine derartige Intervention. Den höchsten Wert 24 h postoperativ verzeichnete die Reaktorgruppe, bei der man, im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen, mit dem invasivsten aller Verfahren unter Laborbedingungen kryokonservierte Hepatozyten behandelt hat. Eine resultierende Überlegung daraus, dass die Tiere der Reaktorgruppe aufgrund von externem Endotoxineinfluss früher sterben, ließ sich nicht bestätigen. Ein Reaktorschwein wies sogar die längste Überlebenszeit auf. Es lässt sich zudem auch keine Korrelation zwischen längerer Überlebenszeit und Höhe der ET-Konzentration nachweisen.

Eine bis zum Exitus zunehmende ET-Konzentration zeigte sich nur in Einzelfällen. Im Gegenteil waren die ET-Konzentrationen im Verlauf auf niedrigem Niveau stabil verlaufend. Erst (prä-)final kam es zu steilen und deutlichen Anstiegen. Erklärungsansätze hierfür werden im Folgenden dargestellt.

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 angesprochen, korreliert der Verlauf des IL-6 mit der Schwere einer Entzündung, dem Ausmass der Organdysfunktion und letztlich der Mortalität im Rahmen eines SIRS/MOF. Einen Anstieg zeigte die IL-6-Konzentration auch in dieser Arbeit; dieses Phänomen erfolgt etwa zeitgleich bis etwas zeitversetzt nach dem Anstieg der Endotoxinkonzentration und der Manifestation des SIRS, zu denen sich jedoch keine Korrelation zeigte. Dies wurde auch experimentell durch Fong et al. gezeigt, welche ebenfalls eine Steigerung des IL-6 nach Verabreichung von ET beschrieben und dabei ein Kon-

zentrationsmaximum nach 2 – 4 h nach Endotoxingabe beschrieben. (108) Die Bestimmung von Prostaglandin F<sub>2α</sub>-Metaboliten als sensitiven Marker des ET-Einflusses durch Cort et al., wurde durch die Messung von IL-6 abgelöst (87). IL-6 wirkt in der Zytokinreihe eher protektiv durch Modulation von proinflammatorischen Mediatoren. Simultan zu den proinflammatorischen Mediatoren gibt es, wie oben beschrieben, auch antiinflammatorische, die in der Frühphase aktiviert werden. Diese gegensätzlichen Mechanismen bilden eine Balance. Ein derartiger kompensierter Verlauf lässt sich auch in dieser Studie feststellen, bei der man für die IL-6-Konzentration bis zum finalen Anstieg einen durchgehend flachen Verlauf erhält. Eine Erklärung hierfür ist, dass sich das SIRS stufenweise entwickelt, erst ab einem gewissen Zeitpunkt dekompenziert und dann massiv, unregelmäßig und unkontrolliert sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirkt und rasch zum Exitus letalis führt (3, 18). Die zum Todeszeitpunkt gemessene nicht signifikante Leukozytopenie werten wir ebenfalls als septisches Zeichen. TNF-alpha, als weiterer Marker der Sepsis, kann nicht herbeigezogen werden, denn Werte konnten lediglich bei drei Tieren und nur zum Exituszeitpunkt gemessen werden. Sämtliche andere Proben lagen unter der Nachweisgrenze. Dieses Phänomen ist in der Literatur bekannt (80).

Die Serum-Laktatkonzentration gilt als das Paradekennzeichen der Gewebshypoxie durch die in diesem Fall erhöhte aerobe und anaerobe Produktion. Zudem ist Laktat ein Marker für inflammatorische Prozesse und für die Kontrolle einer effektiven Therapie. In dieser Studie wird Hypoxie und Inflammation über das SIRS und das darauffolgende MOF, initiiert durch die Operation, ausgelöst. In Ruhe und normalen Umständen kommt die Leber für die Hälfte der Laktat-Clearance auf, was nun wegfällt. Für die andere Hälfte kommen Nieren und Muskeln auf. Unabhängig von der Genese korreliert Laktatazidose laut Backer et al. mit einem geminderten Überleben und einer schlechten Prognose (109). In dem gemessenen Laktat-Verlauf zeigten sich zunächst gut durch den Zelluntergang während der Hepatektomie erklärbare und erhöhte Werte, welche sich postoperativ wieder rasch normalisierten. Hiernach kam es nach kurzer Plateauphase ca. 28 h präfinal zu einem annähernd exponentiellen Anstieg, zeitlich etwas vor dem Endotoxin. Eine statistische Korrelation liess sich

nicht nachweisen. Diesen Zusammenhang bestätigten Danner et al., welche eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Endotoxinämie und einer Erhöhung des Plasmalaktatspiegels fanden (110).

Als Schlussfolgerung dieser Verläufe lässt sich sagen, dass sich trotz der durchgehenden maximalen intensivmedizinischen Therapie eine Sauerstoffunterversorgung und eine progrediente Infektsituation im Rahmen des SIRS aufzeigen lässt. In Hinblick auf die Konzentration des wichtigsten intrazellulären Kations Kalium lässt sich sagen, dass mithilfe der maximalen Intensivmedizin und trotz der Schwierigkeit einer progredienten Niereninsuffizienz der Kaliumwert bis zur finalen Dekompensation durchgehend stabil zwischen 3,4 und 3,9 mmol/l gehalten werden konnte. Erst zum Exituszeitpunkt ließ sich eine schwere Hyperkaliämie nachweisen, was mit einem massiven Zelluntergang im Rahmen des MOF vereinbar ist. Eine solche Hyperkaliämie kann zu vital bedrohlichen Herzrhythmusstörungen führen und wird durch eine gleichzeitig vorliegende Azidose (siehe Laktat) verstärkt (111).

Das Phänomen des (prä-)finalen, nicht signifikanten Anstiegs der Kaliumkonzentration der „High-ET-Gruppe“ mit dem Grenzwert von  $ET > 400$  pg/ml, könnte darin begründet sein, dass eine Wechselwirkung bestehen kann zwischen den systemischen Mechanismen der Hyperinflammation/Immunparalyse mit resultierendem fulminantem MOF (Zelluntergang/Hyperkaliämie) auf der einen Seite, und der raschen Endotoxinämie auf der anderen. Diese Wechselwirkung ist in beide Richtungen denkbar (70, 76, 77, 112).

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, kam es zu einer langen, auf niedrigem Niveau stabilen Phase der ET-Konzentration und erst ab dem Zeitpunkt 16 Stunden präfinal zu einem starken Anstieg, welcher in etwa den Verläufen von IL-6, als Marker für Entzündungsschwere und Organdysfunktion, und Kalium, als Marker für Zelltod, entspricht. Tendenziell entspricht der ET- auch dem Laktat-Anstieg, als Marker für Gewebshypoxie, der aber schon früher und langsamer einsetzt. Diese Parameter charakterisieren die Effekte und die Manifestation eines SIRS. In diesem Rahmen kam es zur systemischen Dekompensation, darauffolgendem MODS/MOF und dem Endpunkt für diesen

unter antibiotischer Therapie kompensierten Vorgang. Dies bedeutete das Ende des anhepatischen Überlebens.

Einschränkungen müssen bezugnehmend auf die gemessenen ET-Werte gemacht werden, da diese, wie auch weitere kardiovaskuläre und laborchemische Parameter sowie die Körpertemperatur durch die intensivmedizinische Therapie beeinflusst worden sein könnten. Aufgrund von Vasopressoren, Verdünnung und Kühlen durch Massentransfusion könnten sie von den wahren Werten abweichen. In Bezug auf ET könnten folglich vereinzelt gemessene ET-Verläufe ohne eine deutliche Steigerung zum Todeszeitpunkt möglicherweise durch einen Verdünnungseffekt die falsche Konzentration abbilden. Am ehesten ist diese Art der Messfehler auch ursächlich für das finale Absinken der ET-Konzentration bei der Dialysegruppe und für das leichte Absinken der IL-6-Konzentration zum Zeitpunkt 8 h präfinal.

Bei den Messmethoden von IL-6 und ET müssen desgleichen einige Einschränkungen erwähnt werden. So muss dem humanen IL-6-Testkit eine gewisse Fehlerquote bzw. eine eingeschränkte Spezifität eingeräumt werden, wengleich gemäss Hersteller eine hundertprozentige Kreuzreaktion mit porcinen Zytokinen vorliegt (91). Erschwerend in Bezug auf die Bestimmung der ET-Konzentrationen ist die Tatsache, dass diese sehr gering sind und an der Nachweisgrenze der LAL-Methode liegen. Zudem besteht bei dieser hochsensitiven Methode die Gefahr einer präanalytischen Verunreinigung, des Weiteren gilt diese als nicht vollständig quantitativ, sondern beinhaltet eine gewisse Variabilität. Die Messgenauigkeit ist insofern limitiert, als dass sie sich an einem Referenzendotoxin, in dieser Arbeit das Kontroll Standard Endotoxin E. coli 055 von Charles River Endosafe, orientiert. Ein anderes ET kann den Assay in anderem Umfang aktivieren. Verschiedene andere, zum Teil nicht genau bekannte Faktoren können ebenfalls einen Einfluss auf das Messergebnis haben, weshalb die Proben während der Bestimmung wärmebehandelt werden. Die erhaltenen Ergebnisse müssen folglich als semi-quantitativ betrachtet werden, da die Möglichkeit von sowohl falsch positiven, als auch falsch negativen Ergebnissen besteht (90). Ein exakter Vergleich aller vier dargestellten Parameter wird auch deshalb erschwert, da ET und IL-6 aufgrund der aufwändigen Bestimmung

achtstündlich, Laktat und Kalium jedoch stündlich – in dieser Arbeit nur vierstündlich dargestellt - gemessen wurden.

Es bleibt die kausale Frage, ob die Endotoxinämie eine Folge des SIRS ist oder ob der finale Endotoxinanstieg die Ursache für den letalen septischen Zustand darstellt und Endotoxin deshalb als limitierender Faktor angesehen werden kann.

Einmal kann es unabhängig von einem SIRS auf physiologische Weise zu einer Endotoxinämie kommen: Es gibt tageszeitliche Schwankungen der Endotoxinämie in Nahrungskarenzphasen bei gesteigerter Translokation von physiologisch vorhandenem ET (81). Langzeitige parenterale Ernährung über fünf Tage hat einen ähnlichen Effekt, eine kurzzeitige scheint jedoch die intestinale Permeabilität nicht zu beeinflussen (82, 113, 114). Durch das Fehlen von Hepatozyten und der ortsständigen Kupfferzellen in dieser Studie können diese ihre Filterfunktion für das Portalblut nicht erfüllen (63, 64). Zudem können sie dann auch keine inflammatorischen oder antiinflammatorischen Zytokine bilden (115), was ein kausaler Faktor für die lange „Stase“ bzw. Kompensation der Versuchstiere gewesen sein könnte. Neben der Leber kann auch die Lunge u.a. mittels gewebständiger Makrophagen Mikroorganismen aus dem peripheren und Portalblut eliminieren. Denkbar ist, dass es beim Überschreiten dieser Kapazität zu dem beobachteten steilen ET-Anstieg kommt.

Lumsden et al. betonten das Vorhandensein einer systemischen Endotoxinämie bei einer Leberpathologie (z.B. bei der Zirrhose) und die Möglichkeit der Steigerung in Stresssituationen, was in unserer Studie Anwendung findet (67). Abgesehen von diesen genannten Mechanismen sind auch trotz der standardisierten und sicheren Hepatektomie iatrogene, intraoperative Mikroläsionen der Darmmukosa vorstellbar, welche eine Translokation begünstigt haben könnten.

Auf der anderen Seite kann es auch durch pathophysiologische Mechanismen beispielsweise als Folge eines ALF über ein SIRS sowie konsekutiver Endotoxinämie zur Ausbildung eines MODS/MOF kommen: Der Zusammenhang zwischen ALF und einem resultierenden SIRS ist bekannt (6). Es gibt nun die Theorie, dass im folgenden Verlauf ohne Vorliegen eines septischen Fokus der GI-Trakt mit einer funktionell gestörten Darmbarriere und erhöhter Permeabilität

die zentrale Rolle einnimmt. Der Mechanismus dieser Veränderungen ist in ihren genauen Einzelheiten nicht bekannt, es gibt jedoch Hinweise verschiedener Arbeitsgruppen, dass als Ursache eine mesenteriale Ischämie zugrunde liegen kann: In experimenteller Sepsis oder Endotoxinämie zeigte sich der Blutfluss der A. mesenterica superior signifikant gemindert sowie eine Azidose der Darmschleimhaut (116). Bauer et al. beschrieben einen weiteren pathophysiologischen Ansatz, bei dem es ausgelöst durch eine Kreislaufinsuffizienz via lokaler Mechanismen zu einer ischämischen Schädigung der Darmzottenspitzen bis zur Nekrose kommt, was zu einem Verlust der Mukosabarriere führen kann (70, 85). Durch diese Störungen auf der Ebene der (Mikro-)Zirkulation kann es zur bakteriellen Translokation mit dem Übertritt von Bakterien und Toxinen ins Pfortaderstromgebiet und das Lymphsystem kommt (70). Dies kann daraufhin zur generalisierten Endothelzellaktivierung und Schädigung von entfernt liegendem Organewebe führen (3). In einer Studie von Otamiri et al. wurde nachgewiesen, dass eine intestinale Ischämie den Anstieg der mukosalen Permeabilität teilweise reversibel induziert (112). Ferner konnte Jargon in einer Studie eine Dynamik der Permeabilität nachweisen, wobei diese nach 72 postoperativen Stunden, abhängig vom Ausmass eines operativen Eingriffs, auf das Maximum anstieg (117). Endotoxin kann in der Folge prinzipiell einen inflammatorischen Zustand induzieren, oder den bestehenden aufrechterhalten und weiter intensivieren. ET kann dabei sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Zytokine freisetzen (3, 70, 74, 75). Als Endpunkt kann dies zum Multiorganversagen führen (6).

Liegt ein frühes MOF vor, ist die Ursache wahrscheinlich ein abakterielles SIRS, das als massive proinflammatorische Reaktion zu einer generalisierten Endothelzellaktivierung und dadurch direkt oder indirekt zur Schädigung des Gewebes geführt hat. Dies kann innerhalb weniger Tage zum Tod führen (3, 75). Zu einem späten MOF ab dem „Initialtrauma“ kann es nach einigen Tagen oder später kommen, wenn sich ausgehend von einer bakteriellen Translokation ein Missverhältnis zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen gebildet und sich eine Immunparalyse entwickelt hat (3, 75).

Neben der enteralen Translokation kann es zusätzlich auch bei invasiver Beatmung, wie in dieser Studie praktiziert, zu lokaler und systemischer Entzündung durch eine Permeabilitätszunahme im Bronchialsystem kommen (70). Bei kritisch kranken Patienten kann es darüber hinaus zu einer Änderung bzw. dem Überwachsen der relativ avirulenten Bakterienbesiedlung im Magen und dem oberen GI-Trakt in Richtung typisch pathogener Keime kommen. Ein ätiologischer Faktor hierbei ist eine gastrointestinale Motilitätsstörung (118). Grundsätzlich haben neben gramnegativen Bakterien und Endotoxin ebenfalls grampositive Bakterien und Pilze die Fähigkeit, zu translozieren (3). Bei zirrhotischen Patienten wurde ein Zusammenhang zwischen einer Veränderung der Bakterienbesiedlung des Dünndarms und einer systemischen Endotoxämie nachgewiesen, weshalb die veränderte Darmbesiedlung als Risikofaktor der Translokation einzustufen ist (16, 119).

Es gibt eine Vielzahl von Ansätzen, die auf die Eliminierung von Pathogenen bei Risikopatienten für MOF abzielen: Das ist zunächst das Etablieren einer antibiotischen Therapie zur Prophylaxe und bei klinischer Verschlechterung der Wechsel des Antibiotikums. In unserer Studie wurde aus Gründen der Standardisierung und aufgrund der zeitlich schnellen Dekompensation auf einen Antibiotikumwechsel verzichtet. Darüber hinaus weisen Studien einen Schutz durch selektive Darmdekontamination (SDD), selektive oropharyngeale Dekontamination (SOD) und medikamentöse Stressulcusprophylaxe nach und zeigen damit indirekt eine Verringerung der Translokation (113). Auf diese Weise können gramnegative Bakterien, *Staphylococcus aureus* und Pilze aus dem GI-Trakt eliminiert oder dezimiert und die durch Mikroaspiration entstehende sekundäre Kolonisation des Oropharynx verhindert werden. Eine grosse niederländische Studie wies einen vorteilhaften Effekt von SDD und SOD mit Verringerung der Mortalität nach, wenngleich die definitiven Langzeiteffekte bezüglich der Bakterienresistenzen aktuell noch nicht vollständig bekannt sind (28). In der Literatur werden darmspezifische Nährstoffe beschrieben, welche als ET-Translokationsprophylaxe wirken: Neben Vitamin A, Arginin, dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor IGF 1 und dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF scheint insbesondere Glutamin, auch appliziert in einer parenteralen Ernährung,

die Enterozyten und die intestinale Mukosa zu schützen (80, 114). Im Zusammenhang mit Endotoxinämie zeigt eine aktuelle Studie einer chinesischen Arbeitsgruppe einen vielversprechenden Ansatz im Bereich der extrakorporalen Absorptionsverfahren mittels Membranen, bei dem bei der Behandlung von septischen Schweinen ein therapeutischer Effekt und eine Reduktion der Konzentrationen an Endotoxin, TNF- $\alpha$  und IL-6 nachgewiesen werden konnte (120). Weitere Untersuchungen befassen sich mit einer Senkung der Mortalität durch das Binden und Neutralisieren von ET durch Antikörper und ET-neutralisierende Peptide (3).

Es gibt zusammenfassend verschiedene Faktoren, die zu einer Endotoxinämie führen: Physiologische, ohne Vorhandensein eines SIRS, und pathophysiologische in Gegenwart eines SIRS. Ätiologisch kann bei der Endotoxinämie folglich von einer Kombination ausgegangen werden, welche annäherungsweise dem Verlauf von IL-6, Laktat und Kalium im Blut entspricht. Generell anerkannt ist der Zusammenhang zwischen Endotoxinämie und dessen Beeinflussung eines SIRS. Über den Stellenwert von ET als prognostischen Faktor gibt es keine einhellige Meinung. Einige Studien fanden eine direkte Korrelation von Serum-ET-Konzentrationen mit eintretenden Komplikationen und der Mortalität (121), wohingegen andere Untersuchungen keine Verknüpfung zwischen Endotoxinämie und dem Überleben nachweisen konnten (122).

In dieser Studie beobachtete man ein langsam progredientes SIRS, dass nach einigen Tagen, wie von Bone beschrieben, zu einem „späten“ MOF nach einigen Tagen führte. Es zeigten sich durchgehend keine Hinweise für einen definitiven Infektfokus und für operative Komplikationen. Ab einem bestimmten Zeitpunkt dekompensierte das SIRS, dass sich auch mithilfe der Kenngrößen IL-6, Laktat und Kalium diagnostizieren lässt, und führte innerhalb von 16 Stunden zum Exitus letalis. Dies spiegelt sich auch im Endotoxinverlauf wieder. Die bereits angesprochene Arbeit von Jargon beschreibt ebenfalls ein ähnliches Muster einer im Intervall stattfindenden Entwicklung und er nennt ein Maximum sowohl der intestinalen Permeabilität, der bakteriellen Translokation und der Zytokinaktivierung nach 72 h postoperativ beim Menschen. Ein von ihm beschriebener Anstieg 24 h postoperativ und rückläufige Werte 120 h postoperativ

finden sich hier nicht (117). Andere Autoren beschreiben ebenfalls schneller erfolgende maximale ET-Konzentrationssteigerungen, Bahrami et al. fanden diese bei Pavianen im hämorrhagischem Schock bereits nach 3 Stunden nach Beginn der Schockperiode (80). In der vorliegenden Studie zeigte sich keine signifikante Steigerung nach wenigen Stunden, wenngleich die Messabstände weiter gewählt wurden, sondern analog zu Jargon erst nach mehrtägiger Zeitspanne eine abrupte Endotoxinschwemme. Die Zeit des postoperativen Maximums entspricht aufgrund des Studiensettings nicht genau der Vergleichszeit von 72 h. Ein Grund für den massiven und raschen Charakter der Endotoxinsteigerung könnte ein sich gegenseitig verstärkender Effekt sein: Deitch et al. zeigten an Mäusen, dass ET die bakterielle Translokation aus dem Darm fördert und auf diese Art auf ein MOF potenzierend wirkt (123).

Es lässt sich schlussfolgern, dass für die Entstehung eines SIRS/MOF hauptsächlich die im Intervall stattfindenden pathophysiologischen Störungen der intestinalen Permeabilität mit bakterieller Translokation von Bedeutung sind. Ob die finale Endotoxinämie letztlich durch die erhöhte Darmpermeabilität und konsekutive bakterielle Dislokation bedingt ist, kann im Rahmen dieser Studie nicht vollständig beantwortet werden. Ein sicherer Beweis für diese Hypothese wäre erst gegeben durch direkten Nachweis einer positiven Bakterienkultur aus dem peripheren Blut oder aus mesenterialen Lymphknoten. Bakterienkultivierungen erfolgten bei dieser Arbeit, bei der es wesentlich um das Etablieren eines porcinen Tiermodells des ALF ging, nicht. Auch wenn vermutlich nicht alle Tiere an dem durch das ET und bakterieller Translokation beeinflussten SIRS gestorben sind, da ET auch nicht in allen Fällen anstieg, so bedeutete das Auftreten einer (prä)finalen Endotoxinämie eine schlechte Prognose und den letalen Ausgang. Dies wird durch mehrere Autoren bestätigt, welche dem ET eine wichtige Rolle bei der hohen Morbidität und Mortalität des septischen Schocks zuschreiben (110, 114).

Als Ergebnis dieser Arbeit kann die Hypothese von Lemaire et al. unterstrichen werden, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen bakterieller Translokation und einer späten Manifestation des MOF gibt (3). Folglich kann ET als limitierender Faktor der Überlebenszeit angesehen werden. Um den Zusam-

menhang zwischen Endotoxinämie, enteraler Permeabilität, bakterieller Translokation, die Rolle der Leber und dem MOF besser zu verstehen, sind in der Zukunft weitere klinische Studien notwendig.

Bezugnehmend auf das Gebiet der Leberersatzverfahren kann anhand dieser Studie neben einer maximalen intensivmedizinischen Therapie keine additive Methode als Goldstandard für Patienten im ALF als Bridgingtherapie empfohlen werden. Es gilt, den Faktor ET künftig weitmöglichst zu eliminieren und auf diesem Weg das Überleben der Patienten zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Um ein bestmögliches Tiermodell für den Verlauf des Akuten Leberversagens zu erhalten und die Rolle des Endotoxins (ET), einem Schlüsselfaktor in der Pathogenese der gramnegativen Sepsis, zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser experimentellen Arbeit 20 Schweine unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen hepatektomiert und grundsätzlich intensivmedizinisch therapiert. Darüber hinaus wurden weitere temporäre Behandlungsstrategien angewendet. Es erfolgten dabei Messungen von Endotoxin und anderen laborchemischen Parametern im Hinblick auf den Gewinn von Erkenntnissen für den Verlauf und die Prognose von kritisch kranken Patienten, wobei eine Verlängerung des Überlebens im Sinne eines Bridgings, als Vorstufe einer Lebertransplantation, angestrebt wurde.

Nach standardisierter und kompletter Hepatektomie mit geringem Blutverlust erfolgte eine standardisierte maximale intensivmedizinische Therapie zur Prophylaxe von Komplikationen. Es erfolgte eine an der humanen intensivmedizinischen Praxis orientierte und etablierte Therapie, einschließlich einer antibiotischen wie auch einer Transfusionsbehandlung. Drei weitere Studienäste verglichen die Kontrollgruppe mit ausschließlicher maximaler Intensivtherapie mit Therapiegruppen mit zusätzlichem temporären Leberzellreaktor, Dialyse- oder Plasmapheresebehandlung. Die Tiere befanden sich dabei konform der Europäischen Tierschutzrichtlinien bis zum Exitus letalis in Intubationsnarkose (ITN) und totaler intravenöser Anästhesie (TIVA). Die ET-Messung erfolgte prä- sowie postoperativ und in der anhepatischen Phase dreimal täglich, die ET-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der LAL-Methode. Einzelne Tierkadaver wurden zur Evaluation autopsiert.

Es gelang bei dieser Studie, ein optimales Tiermodell zu entwickeln, das als anhepatische Anordnung ein ALF klinisch simulieren kann. Zudem wurde eine sichere und gut reproduzierbare Methode zur Gewinnung von Blutprodukten etabliert. Es zeigten sich im klinischen Verlauf die Manifestationen des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), das Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) bis hin zum Multiorganversagen (MOF), welches in allen Fällen

zum Exitus letalis führte. Die maximale Überlebenszeit betrug unabhängig von den Behandlungsstrategien ca. 85 h und die mittlere Überlebenszeit  $51 \pm 19$  Stunden. Es zeigte sich kein Hinweis auf einen definitiven Infektfokus und operative Komplikationen. Die ET-Konzentration wies in den verschiedenen Therapiegruppen im Mittel einen lange und durchgehend auf niedrigem Niveau gleichbleibenden Charakter auf und stieg erst ab dem Zeitpunkt 16 Stunden präfinal plötzlich und massiv an. Dies entsprach den Verläufen von IL-6, als Marker für Entzündungsschwere, und Kalium, als Marker für Zelltod. Der Anstieg von Laktat, als Marker für Gewebshypoxie, zeigte sich schon früher einsetzend und konstanter ansteigend. Das SIRS führte erst nach einiger Zeit ab diesem bestimmten Zeitpunkt zur Dekompensation und dann massiv, unkontrolliert und rasch zum Exitus letalis.

Das angewendete anhepatische porcine Modell stellt eine geeignete klinikorientierte Methode dar, die Funktionalität und Sicherheit von Leberersatzverfahren zu prüfen. Es stellt einen neuen Vergleichsmassstab zu anderen Methoden dar und befindet sich gegenüber publizierten porcinen Tiermodellen unter denen mit der längsten Überlebenszeit. Zudem trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, die pathophysiologischen Prozesse und beeinflussende Faktoren der Überlebenszeit in diesem Modell des ALF unter intensivmedizinischen Bedingungen zu erkennen und besser zu verstehen. Durch verschiedene pathophysiologische Effekte kommt es in Gegenwart eines SIRS wahrscheinlich im Intervall zu einer Störung der Darmbarriere, einer bakteriellen Translokation und zur konsekutiven Endotoxämie mit den entsprechenden klinischen Folgen. Wenngleich die genauen Umstände für den abrupten Anstieg unklar bleiben, kann Endotoxin als ein zentraler und prognostisch limitierender Faktor der Überlebenszeit angesehen werden und stellt einen kausalen Zusammenhang zum MOF dar. Um die genauen Zusammenhänge zwischen ALF, MOF, Endotoxämie und der bakteriellen Translokation besser zu verstehen, sind zukünftig weitere klinische Studien notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Böker KHW (2001) Akutes Leberversagen. Internist (Berl) 2001: 545-563.
2. Bauer M, Paxian M and Kortgen A (2004) Akutes Leberversagen. Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie. Anaesthesist 53: 511-530.
3. LEMAIRE LCJM, van LANSCHOT JJB, STOUTENBEEK CP, van DEVENTER SJH, WELLS CL and GOUMA DJ (1997) Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. Br J Surg 84: 1340-1350.
4. Lee WM, Squires RH, Nyberg SL, Doo E and Hoofnagle JH (2008) Acute liver failure: Summary of a workshop. Hepatology (Baltimore, Md ) 47: 1401-1415.
5. O'Grady JG, Schalm SW and Williams R (1993) Acute liver failure: re-defining the syndromes. Lancet 342: 273-275.
6. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A and Wendon J (2010) Acute liver failure. Lancet 376: 190-201.
7. Goris RJA, te Boekhorst TPA, Nuytinck JKS and Gimbrere JSF (1985) Multiple-Organ Failure: Generalized Autodestructive Inflammation? Archives of Surgery 120: 1109-1115.
8. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA and Balk RA (1987) A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 317: 653-658.
9. Deitch EA (1992) Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg 216: 117-134.
10. Nystrom PO (1998) The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 41: 1-7.
11. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM and Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 101: 1644-1655.
12. Bone RC (1991) Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. Chest 100: 802-808.

13. Bihari DJ, Gimson AE and Williams R (1986) Cardiovascular, pulmonary and renal complications of fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 6: 119-128.
14. Larson AM (2010) Diagnosis and management of acute liver failure. *Curr Opin Gastroenterol* 26: 214-221.
15. Larcher VF, Wyke RJ, Mowat AP and Williams R (1982) Bacterial and fungal infection in children with fulminant hepatic failure: possible role of opsonisation and complement deficiency. *Gut* 23: 1037-1043.
16. Lenz K (2010) Spontane bakterielle Peritonitis. *DoctorConsult - The Journal Wissen für Klinik und Praxis* 1: e157-e160.
17. Rolando N, Philpott-Howard J and Williams R (1996) Bacterial and fungal infection in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 16: 389-402.
18. Antoniadou CG, Berry PA, Wendon JA and Vergani D (2008) The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol* 49: 845-861.
19. Rifai K and Bahr MJ (2003) Akutes Leberversagen. *Internist (Berl)* 44: 585-90, 592.
20. O'Grady J (2012) Liver transplantation for acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26: 27-33.
21. Ytrebø LM, Korvald C, Nedredal GI, Elvenes OP, Nielsen Grymyr OJ and Revhaug A (2001) N-acetylcysteine increases cerebral perfusion pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 29: 1989-1995.
22. Molnár Z, Shearer E and Lowe D (1999) N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 27: 1100-1104.
23. Pereira SP, Langley PG and Williams R (1996) The management of abnormalities of hemostasis in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 16: 403-414.
24. Macdougall BR, Bailey RJ and Williams R (1977) H<sub>2</sub>-receptor antagonists and antacids in the prevention of acute gastrointestinal haemorrhage in fulminant hepatic failure. Two controlled trials. *Lancet* 1: 617-619.
25. Jonge E, Schultz MJ, Spanjaard L, Bossuyt PMM, Vroom MB, Dankert J and Kesecioglu J (2003) Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care: a randomised controlled trial. *Lancet* 362: 1011-1016.

26. Krueger WA, Lenhart FP, Neeser G, Ruckdeschel G, Schreckhase H, Eissner HJ, Forst H, Eckart J, Peter K and Unertl KE (2002) Influence of combined intravenous and topical antibiotic prophylaxis on the incidence of infections, organ dysfunctions, and mortality in critically ill surgical patients: a prospective, stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1029-1037.
27. Fisher NC, Cooper MA, Hastings JG and Mutimer DJ (1998) Fungal colonisation and fluconazole therapy in acute liver disease. *Liver* 18: 320-325.
28. Smet AM, Kluytmans JAJW, Blok HEM, Mascini EM, Benus RFJ, Bernards AT, Kuijper EJ, Leverstein-van Hall MA, Jansz AR, Jongh BM, van Asselt GJ, Frenay IHME, Thijsen SFT, Conijn SNM, Kaan JA, Arends JP, Sturm PDJ, Bootsma MCJ and Bonten MJM (2011) Selective digestive tract decontamination and selective oropharyngeal decontamination and antibiotic resistance in patients in intensive-care units: an open-label, clustered group-randomised, crossover study. *Lancet Infect Dis* 11: 372-380.
29. Polson J and Lee WM (2005) AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology (Baltimore, Md)* 41: 1179-1197.
30. McKenzie T, Lillegard J and Nyberg S (2008) Artificial and Bioartificial Liver Support. *Semin Liver Dis* 28: 210-217.
31. Horn N, Unger J and Rossaint R (1999) Extrakorporale Leberunterstützungsverfahren in der Therapie des akuten Leberversagens. Eine Standortbestimmung. *Anaesthesist* 48: 387-394.
32. Fisher RA and Strom SC (2006) Human Hepatocyte Transplantation: Worldwide Results. *Transplantation* 82: 441-449.
33. Pascher A, Sauer IM, Hammer C, Gerlach JC and Neuhaus P (2002) Extracorporeal liver perfusion as hepatic assist in acute liver failure: a review of world experience. *Xenotransplantation* 9: 309-324.
34. Sechser A, Osorio J, Freise C and Osorio RW (2001) Artificial liver support devices for fulminant liver failure. *Clin Liver Dis* 5: 415-430.
35. Kamohara Y, Rozga J and Demetriou AA (1998) Artificial liver: Review and Cedars-Sinai experience. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 5: 273-285.
36. Gerlach JC (2006) Bioreactors for extracorporeal liver support. *Cell Transplant* 15 Suppl 1: S91-103.
37. Chamuleau RAFM, Poyck PPC and van de Kerkhove M-P (2006) Bioartificial liver: its pros and cons. *Ther Apher Dial* 10: 168-174.

38. Mitzner S, Klammt S, Stange J and Schmidt R (2006) Albumin regeneration in liver support-comparison of different methods. *Ther Apher Dial* 10: 108-117.
39. Liu JP, Gluud LL, Als-Nielsen B and Gluud C (2004) Artificial and bioartificial support systems for liver failure. *Cochrane Database Syst Rev* CD003628.
40. Podoll AS, Degolovine A and Finkel KW (2012) Liver support systems-a review. *ASAIO J* 58: 443-449.
41. van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik TM and Chamuleau RAFM (2004) Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials* 25: 1613-1625.
42. Frühauf NR, Kaiser GM, Nosser SA, Bader A and Oldhafer KJ (2001) Large animal models for testing bioartificial liver support systems. *Bio-med Sci Instrum* 37: 511-516.
43. Schenk, T. (2005) Neuromonitoring bei Akutem Leberversagen. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
44. Lee WM (2008) Acetaminophen-related acute liver failure in the United States. *Hepatology* 38 Suppl 1: S3-S8.
45. Takada Y, Ishiguro S and Fukunaga K (2003) Large-animal models of fulminant hepatic failure. *J Artif Organs* 6: 9-13.
46. Ho DWY, Lam DK, Chen YB, To J, Ng IOL and Fan ST (2002) Galactosamine-induced fulminant liver failure--observation in a porcine model. *Asian J Surg* 25: 73-79.
47. Ryska M, Kieslichová E, Pantoflíček T, Ryska O, Zazula R, Skibová J and Hájek M (2004) Devascularization surgical model of acute liver failure in minipigs. *Eur Surg Res* 36: 179-184.
48. Chen XP, Xue YL, Li XJ, Zhang ZY, Li YL and Huang ZQ (2001) Experimental research on TECA-I bioartificial liver support system to treat canines with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 7: 706-709.
49. Knubben K, Thiel C, Schenk M, Etspüler A, Schenk T, Morgalla MH and Königsrainer A (2008) A new surgical model for hepatectomy in pigs. *Eur Surg Res* 40: 41-46.
50. Fournau I, Pirenne J, Roskams T and Yap SH (2000) An improved model of acute liver failure based on transient ischemia of the liver. *Arch Surg* 135: 1183-1189.
51. Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM and González-Gallego J (2009) An overview of animal models for investigating the pathogenesis and thera-

- peptic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol* 15: 3086-3098.
52. Terblanche J and Hickman R (1991) Animal models of fulminant hepatic failure. *Digest Dis Sci* 36: 770-774.
  53. Rylander R (2002) Endotoxin in the environment - exposure and effects. *Journal of Endotoxin Research* 8: 241-252.
  54. Beutler B and Rietschel ET (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3: 169-176.
  55. Mattsby-Baltzer I, Lindgren K, Lindholm B and Edebo L (1991) Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. *Infect Immun* 59: 689-695.
  56. Shao B, Munford RS, Kitchens R and Varley AW (2012) Hepatic uptake and deacylation of the LPS in bloodborne LPS-lipoprotein complexes. Innate immunity.
  57. Burrell R (1990) Immunomodulation by Bacterial Endotoxin. *Critical Reviews in Microbiology* 17: 189-208.
  58. Bone RC (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115: 457-469.
  59. Wolff SM (1973) Biological effects of bacterial endotoxins in man. *J Infect Dis* 128: Suppl.
  60. Rietschel ET, Brade L, Brandenburg K, Flad HD, Jong-Leuveninck J, Kawahara K, Lindner B, Loppnow H, Lüderitz T and Schade U (1987) Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 5: S527-S536.
  61. West MA and Heagy W (2002) Endotoxin tolerance: a review. *Crit Care Med* 30: S64-S73.
  62. Prytz H, Holst-Christensen J, Korner B and Liehr H (1976) Portal venous and systemic endotoxaemia in patients without liver disease and systemic endotoxaemia in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 11: 857-863.
  63. Fox ES, Thomas P and Broitman SA (1988) Uptake and modification of <sup>125</sup>I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Hepatology* 8: 1550-1554.
  64. van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S and Wesdorp RI (1994) Clinical significance of translocation. *Gut* 35: S28-S34.

65. Hewett JA, Schultze AE, VanCise S and Roth RA (1992) Neutrophil depletion protects against liver injury from bacterial endotoxin. *Lab Invest* 66: 347-361.
66. Fantone JC and Ward PA (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 395-418.
67. Lumsden AB, Henderson JM and Kutner MH (1988) Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 8: 232-236.
68. Fausto N, Campbell JS and Riehle KJ (2006) Liver regeneration. *Hepatology* 43: S45-S53.
69. Brade H, Brade L, Schade U, Zähringer U, Holst O, Kuhn HM, Rozalski A, Röhrscheidt E and Rietschel ET (1988) Structure, endotoxicity, immunogenicity and antigenicity of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins, O-antigens). *Prog Clin Biol Res* 272: 17-45.
70. Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H and Reinhart K (2006) Sepsis. *Anaesthetist* 55: 835-845.
71. Tobias PS, Mathison JC and Ulevitch RJ (1988) A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 263: 13479-13481.
72. Wright S, Ramos R, Tobias P, Ulevitch R and Mathison J (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433.
73. Dinarello CA (1991) The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 163: 1177-1184.
74. Suárez-Santamaría M, Santolaria F, Pérez-Ramírez A, Alemán-Valls MR, Martínez-Riera A, González-Reimers E, La Vega MJ and Milena A (2010) Prognostic value of inflammatory markers (notably cytokines and procalcitonin), nutritional assessment, and organ function in patients with sepsis. *Eur Cytokine Netw* 21: 19-26.
75. Bone RC (1996) Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 125: 680-687.
76. Bochud PY and Calandra T (2003) Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* 326: 262-266.

77. Riedemann NC (2003) The enigma of sepsis. *Journal of Clinical Investigation* 112: 460-467.
78. Lin CY, Tsai IF, Ho YP, Huang CT, Lin YC, Lin CJ, Tseng SC, Lin WP, Chen WT and Sheen IS (2007) Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 46: 816-826.
79. van der Poll T and Lowry SF (1995) Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 3: 1-12.
80. Bahrami S, Redl H, Yao YM and Schlag G (1996) Involvement of bacteria/endotoxin translocation in the development of multiple organ failure. *Curr Top Microbiol Immunol* 216: 239-258.
81. Holst, H. (1994) On the effects induced by ingested and inhaled endotoxin in the pig. *Dissertationsschrift Swedish University of Agricultural Sciences*
82. Gonnella PA, Helton WS, Robinson M and Wilmore DW (1992) O-side chain of *Escherichia coli* endotoxin 0111:B4 is transported across the intestinal epithelium in the rat: evidence for increased transport during total parenteral nutrition. *Eur J Cell Biol* 59: 224-227.
83. Hu QG and Zheng QC (2003) The influence of Enteral Nutrition in post-operative patients with poor liver function. *World J Gastroenterol* 9: 843-846.
84. Klein K, Fuchs GJ, Kulapongs P, Mertz G, Suskind RM and Olson RE (1988) Endotoxemia in protein-energy malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7: 225-228.
85. Bounous G (1982) Acute necrosis of the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 82: 1457-1467.
86. Miert ASJP and Frens J (1968) The Reaction of different animal Species to Bacterial Pyrogens. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 15: 532-543.
87. Cort N, Fredriksson G, Kindahl H, Edqvist LE and Rylander R (1990) A Clinical and Endocrine Study on the Effect of Orally Administered Bacterial Endotoxin in Adult Pigs and Goats. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 37: 130-137.
88. Thiel C, Thiel K, Etspueler A, Schenk T, Morgalla MH, Koenigsrainer A and Schenk M (2010) Standardized intensive care unit management in an anhepatic pig model: new standards for analyzing liver support systems. *Crit Care* 14: R138.

89. Thiel K, Schenk M, Etspüler A, Schenk T, Morgalla MH, Königsrainer A and Thiel C (2011) A simple dummy liver assist device prolongs anhepatic survival in a porcine model of total hepatectomy by slight hypothermia. *BMC Gastroenterol* 11: 79.
90. Cohen J (2000) The detection and interpretation of endotoxaemia. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: S51-S56.
91. Etspueler, A. (2012) Zytokinverlauf im Akuten Leberversagen: Vergleich zwischen Hepatektomie und Amanitinintoxikation am Großtiermodell. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen
92. Norton NS, McConnell JR and Rodriguez-Sierra JF (1997) Behavioral and physiological sex differences observed in an animal model of fulminant hepatic encephalopathy in the rat. *Physiol Behav* 62: 1113-1124.
93. Desille M, Mahler S, Seguin P, Malledant Y, Fremond B, Sebillé V, Bouix A, Desjardins JF, Joly A, Desbois J, Lebreton Y, Champion JP and Clement B (2002) Reduced encephalopathy in pigs with ischemia-induced acute hepatic failure treated with a bioartificial liver containing alginate-entrapped hepatocytes. *Crit Care Med* 30: 658-663.
94. Gao Y, Mu N, Xu XP and Wang Y (2005) Porcine acute liver failure model established by two-phase surgery and treated with hollow fiber bioartificial liver support system. *World Journal of Gastroenterology* 11: 5468-5474.
95. Gerlach JC, Botsch M, Kardassis D, Lemmens P, Schon M, Janke J, Puhl G, Unger J, Kraemer M, Busse B, Bohmer C, Belal R, Ingenlath M, Kosan M, Kosan B, Sultmann J, Patzold A, Tietze S, Rossaint R, Muller C, Monch E, Sauer IM and Neuhaus P (2001) Experimental evaluation of a cell module for hybrid liver support. *International Journal of Artificial Organs* 24: 793-798.
96. Khalili TM, Navarro A, Ting P, Kamohara Y, Arkadopoulos N, Solomon BA, Demetriou AA and Rozga J (2001) Bioartificial liver treatment prolongs survival and lowers intracranial pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Artificial Organs* 25: 566-570.
97. Ladurner R, Hochleitner B, Schneeberger S, Barnas U, Krismer A, Kleinsasser A, Offner F, Königsrainer I, Margreiter R and Königsrainer A (2005) Extended liver resection and hepatic ischemia in pigs: A new, potentially reversible model to induce acute liver failure and study artificial liver support systems. *European Surgical Research* 37: 365-369.
98. Lee KU, Zheng LX, Cho YB, Kim KH, Ha J, Suh KS and Jung SE (2005) An experimental animal model of fulminant hepatic failure in pigs. *Journal of Korean Medical Science* 20: 427-432.

99. Nieuwoudt M, Kunnike R, Smuts M, Becker J, Stegmann GF, Van der Walt C, Nester J and Van der Merwe S (2006) Standardization criteria for an ischemic surgical model of acute hepatic failure in pigs. *Biomaterials* 27: 3836-3845.
100. Sheil AGR, Sun JH, Wang LS, Rao N, Mears DC, Wang CM, Woodman K, Johnston B and Watson J (2000) A biodialysis system for liver support tested in a porcine hepatic failure model. *Australian and New Zealand Journal of Surgery* 70: 127-131.
101. Sosef MN, Abrahamse LSL, van de Kerkhove MP, Hartman R, Chalmereau RAFM and van Gulik TM (2002) Assessment of the AMC-bioartificial liver in the anhepatic pig. *Transplantation* 73: 204-209.
102. Takahashi K, Umehara Y, Umehara M, Nishimura A, Narumi S, Toyoki Y, Hakamada K, Yoshihara S and Sasaki M (2008) Plasma exchange-based plasma recycling dialysis system as an artificial liver support. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 12: 264-270.
103. Fondevila C, Hessheimer AJ, Taura P, Sanchez O, Calatayud D, de Riva N, Munoz J, Fuster J, Rimola A and Garcia-Valdecasas JC (2010) Portal Hyperperfusion: Mechanism of Injury and Stimulus for Regeneration in Porcine Small-for-Size Transplantation. *Liver Transplantation* 16: 364-374.
104. Ho CK, Lee CW, Lu J, Wu J, Koh WP, Chan CY, Homer-Vanniasinkam S and Chao AKH (2009) New Hope for an Old Cure: A Pilot Animal Study on Selective Venesection in Attenuating the Systemic Effects of Ischaemic-Reperfusion Injury. *Annals Academy of Medicine Singapore* 38: 569-575.
105. Yao YM, Yu Y, Sheng ZY, Tian HM, Wang YP, Lu LR and Yu Y (1995) Role of Gut-Derived Endotoxemia and Bacterial Translocation in Rats After Thermal-Injury - Effects of Selective Decontamination of the Digestive-Tract. *Burns* 21: 580-585.
106. Lee WM (1994) Acute Liver-Failure. *American Journal of Medicine* 96: 3-9.
107. RADOSTITS OM (2000) *Veterinary Medicine - A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. London.
108. Fong Y, Moldawer LL, Marano M, Wei H, Tatter SB, Clarick RH, Santhanam U, Sherris D, May LT and Sehgal PB (1989) Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man. *J Immunol* 142: 2321-2324.
109. Backer D (2003) Lactic acidosis. *Intensive Care Med* 29: 699-702.
110. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM and Parillo JE (1991) Endotoxemia in Human Septic Shock. *Chest* 99: 169-175.

111. Doberer E (2008) Kalium: Was man über Kalium wissen sollte. *Akt Ernähr Med* 33: 82-87.
112. Otamiri T, Sjudahl R and Tagesson C (1987) An Experimental-Model for Studying Reversible Intestinal Ischemia. *Acta Chirurgica Scandinavica* 153: 51-56.
113. Marshall JC, Christou NV and Meakins JL (1993) The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg* 218: 111-119.
114. Macfie J (2004) Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *British Medical Bulletin* 71: 1-11.
115. Knolle PA, Löser E, Protzer U, Duchmann R, Schmitt E, Zum Büschenfelde KH, Rose-John S and Gerken G (1997) Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clin Exp Immunol* 107: 555-561.
116. Fink MP, Antonsson JB, Wang H and Rothschild HR (1991) Increased Intestinal Permeability in Endotoxic Pigs: Mesenteric Hypoperfusion as an Etiologic Factor. *Archives of Surgery* 126: 211-218.
117. Jargon, Dirk (2005) Änderungen der intestinalen Permeabilität mit systemischer Zytokinaktivierung nach grossen Operationen bei der Entstehung des Multiorganversagens. Medizinische Dissertationsschrift, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
118. Husebye E, Hellstrom PM, Sundler F, Chen J and Midtvedt T (2001) Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280: G368-G380.
119. Bauer TM, Schwacha H, Steinbruckner B, Brinkmann FE, Ditzen AK, Aponte JJ, Pelz K, Berger D, Kist M and Blum HE (2002) Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia. *American Journal of Gastroenterology* 97: 2364-2370.
120. Zhang M, Zhang L, Cheng LH, Xu K, Xu QP, Chen HL, Lai JY and Tung KL (2012) Extracorporeal endotoxin removal by novel l-serine grafted PVDF membrane modules. *Journal of Membrane Science* 405-406: 104-112.
121. Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P, Skulberg A, Bruun JN, Halvorsen S and Sorensen E (1989) Plasma Endotoxin As A Predictor of Multiple Organ Failure and Death in Systemic Meningococcal Disease. *Journal of Infectious Diseases* 159: 195-204.

122. Elin RJ, Robinson RA, Levine AS and Wolff SM (1975) Lack of Clinical Usefulness of Limulus Test in Diagnosis of Endotoxemia. New England Journal of Medicine 293: 521-524.
123. Deitch EA, Berg R and Specian R (1987) Endotoxin Promotes the Translocation of Bacteria from the Gut. Archives of Surgery 122: 185-190.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Privatdozent Dr. M. Schenk hat die Studie konzipiert und die Arbeit betreut.

Drs. Thiel haben die Eingriffe am Tier durchgeführt.

Drs. Schenk und Etspüler haben zusammen mit mir die Intensivtherapie durchgeführt. Die Anteile an deren Dissertationen sind im Text referenziert.

Ich habe die Proben gewonnen, die Daten gemessen und analysiert sowie die Arbeit geschrieben.

## **8 Danksagung**

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Martin Schenk für das Überlassen dieses Dissertationsthemas, sowie seine Geduld, Motivation und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Meinem Vater bin ich sehr dankbar, dass er mich während meines ganzen Studiums konstruktiv unterstützt hat.

Und Rike für alles.