

Aus der
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum

DISSERTATION

***In- vitro-* evaluation der
Open Loop Albumin Dialysis (OLAD)**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Denis Alekseev
Geboren in Woronesh

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	7
Summary	8
1 Einleitung	9
1.1 Das akute Leberversagen	10
1.1.2 Akute Dekompensation einer chronischen Lebererkrankung	11
1.2 Die Ätiologie des akuten Leberversagens	12
1.3 Pathophysiologie des Leberversagens	17
1.4 Inzidenz und Mortalität des akuten Leberversagens	19
1.5 Die extrahepatischen Komplikationen	19
1.5.1 Kreislaufversagen	19
1.5.2 Das Hepatorenale Syndrom	20
1.5.3 Hepatische Enzephalopathie und Hirnödem.	21
1.6 Therapie des Leberversagens	23
1.6.1 Die Entwicklung der extrakorporalen Leberunterstützung.	24
1.6.2 Bioartifizielle Systeme	26
1.6.3 Artifizielle Leberunterstützung.	28
1.6.4 Indikation für die extrakorporale Leberunterstützung	35
2.0 Fragestellung der Promotionsarbeit	36
3.0 Material und Methoden	36
3.1 Aufbau der „Single-Pass-Albumin-Dialyse“	37
3.2 Aufbau der „Open-Loop-Albumin-Dialyse“	38
3.3 Plasmakreislauf	41
3.4 Zugesezte Toxine	41
3.5 Dialyselösung	42
3.6 Entnahme der Plasmaproben.	42
4.0 Ergebnisse und Statistik	44
4.1 Albumingebundene Toxine	45

4.1.1 Gesamtbilirubin.....	45
4.1.2 Konjugiertes Bilirubin.....	48
4.2 Wasserlösliche Toxine	51
4.2.1 Ammoniak.....	51
4.2.2 Harnstoff.....	54
4.2.3 Kreatinin.....	57
4.2.4 Harnsäure	60
5.0 Diskussion	64
5.1 Anwendung der artifiziellen und bioartifiziellen Leber für die Behandlung des Leberversagens.....	64
5.2 Das Prinzip der Albumin-Dialyse	67
5.3 Direkter Vergleich der Single Pass Albumin Dialysis (SPAD) mit Molecular Adsorbent Recirculation System (MARS).....	71
5.4.Indikationsstellung zur Durchführung einer maschinellen Leberunterstützung.	75
5.5. Markersubstanzen für die Einschätzung der Entgiftungskapazität der Leberunterstützungssysteme.	76
5.6 Das Humanalbumin als Adsorber für Endo- und Exotoxine. Physiologische und chemische Eigenschaften des Albuminmoleküls.	77
6.0 Bewertung der Ergebnisse der aktuellen Studie.....	78
7.0 Thesen zur Dissertation.....	79
Literaturverzeichnis.....	81
Eidesstattliche Versicherung	89
Curriculum Vitae	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Ätiologie des ALV bei Erwachsenen	13
Abbildung 2 Ätiologie des ALV bei Kindern im Alter von 0 bis 3 Jahre	14
Abbildung 3 Ätiologie des ALV bei Kindern im Alter von 3 bis 18 Jahre	15
Abbildung 4 Prometheus-Systems®/Fresenius Medical Care	31
Abbildung 5 MARS®-Kreislauf	32
Abbildung 6 Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs im SPAD-Modus	38
Abbildung 7 Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs im OLAD-Modus	39
Abbildung 8 Versuchsaufbau OLAD	40
Abbildung 9 Veränderung von Plasmakonzentration des Bilirubins	47
Abbildung 10 Veränderung von Plasmakonzentration des konjugierten Bilirubins.....	50
Abbildung 11 Veränderung von Plasmakonzentration des Ammoniaks.	53
Abbildung 12 Veränderung von Plasmakonzentration des Harnstoffes	56
Abbildung 13 Veränderung von Plasmakonzentration des Keratinins	59
Abbildung 14 Veränderung von Plasmakonzentration der Harnsäure.....	62
Abbildung 15 Prinzip der Albumindialyse.....	68
Abbildung 16 Schematische Darstellung von MARS- und im SPAD-Aufbau.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zuordnung von Klassifikation und Ätiologie des Leberversagens	11
Tabelle 2 Ätiologie des akuten Leberversagens.....	15
Tabelle 3 Liste von Medikamenten, die ein ALV induzieren können	16
Tabelle 4 Übersicht der verschiedenen extrakorporalen LUS	34
Tabelle 5 Vier Versuchsreihen mit verschiedenen Geschwindigkeiten der Rezirkulationspumpe im Überblick.....	44
Tabelle 6 Statistikergebnisse: Gesamt-Bilirubin.....	46
Tabelle 7 Statistikergebnisse: konjugiertes Bilirubin.....	49
Tabelle 8 Statistikergebnisse: Ammoniak.....	52
Tabelle 9 Statistikergebnisse: Harnstoff	55
Tabelle 10 Statistikergebnisse: Kreatinin.....	58
Tabelle 11 Statistikergebnisse: Harnsäure	61
Tabelle 12 Affinität der verschiedenen Exo- und Endotoxine zum Albumin.....	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
ADCL	akute Dekompensation einer chronischen Lebererkrankung (engl. acute-on-chronic liver failure = ACLF)
ALV	Akutes Leberversagen
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bioartificial Liver System
BELS	Berlin Extracorporeal Liver Support System
CVVHD	kontinuierliche veno-venöse Hämodialyse
CVVHDF	kontinuierliche veno-venöse Hämodiafiltration
ELAD	Extracorporeal Liver Assist Device
FPSA	Fractionated Plasma Separation and Adsorption
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hepatische Enzephalopathie
HIV	human immunodeficiency virus
HRS	hepatorenales Syndrom
KCC	King's College Criteria
LTX	Lebertransplantation
LUS	Leberunterstützungssystem
MARS	Molecular Adsorbents Recirculating System
MELD	Model of End Stage Liver Disease

MELS-System	Modular Extracorporeal Liver Support
NANB	Non-A Non-B Hepatitis
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OLAD	Open Loop Albumin Dialysis
PAP	Pulmonal-arterieller Druck (engl. pulmonary artery pressure)
PERV	porcine endogene Retroviren
PCWP	Wedge-Druck (engl. Pulmonary Capillary Wedge Pressure)
SPAD	Single-Pass-Albumin-Dialyse
ZVD	Zentraler Venendruck

Zusammenfassung

Diese Arbeit beruht auf der Vermutung, dass im Rahmen der Single Pass Albumin Dialysis das kostenintensive Humanalbumin nicht komplett benutzt und zum großen Teil verworfen wird. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde an der Filtratleitung sowie der Dialysatleitung eine zusätzliche Pumpe für die partielle Rezirkulation der bereits durch den Filter passierten Dialyselösung angeschlossen. Im Gegensatz zum kommerziell erhältlichen MARS®-System wird die albuminhaltige Dialysatlösung nach Passage des Filters nicht gereinigt und zum Teil direkt danach, zum Teil nach erneuter Rezirkulation verworfen. Es wurden vier Reihen der Versuche mit drei verschiedenen Geschwindigkeiten der zusätzlichen Pumpe (180 ml/min, 270 ml/min, 90 ml/min) durchgeführt. Im Rahmen dieser In-vitro-Studie für jedes Experiment (pro Aufbaumodus $n = 4$) wurden 2000 ml toxinbeladenen Plasmas für 6 Stunden von den verschiedenen Aufbaumodi des OLAD-Systems detoxifiziert. Alle Versuche wurden in der CVVHDF-Konfiguration betrieben. Dabei wurden für die Einschätzung der Entgiftungskapazität die Konzentrationen von Ammoniak, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Albumin, Protein und Bilirubin bestimmt. Die Proben wurden vor dem Beginn des Versuchs sowie in bestimmten Zeitintervallen gewonnen. Als Markerstoff für albumingebundene Substanzen wurde Bilirubin gewählt, das durch den OLAD-Modus mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min von $16,5 \pm 0,9$ mg/dl auf $8,0 \pm 1,3$ mg/dl reduziert wurde. Es gelang die Bilirubinkonzentration durch den Aufbau mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 180 ml/min von $17,2 \pm 0,4$ mg/dl auf $9,5 \pm 0,8$ mg/dl zu senken. Beim Erhöhen der Rezirkulationsgeschwindigkeit auf 270 ml/min gelang die Reduktion des Bilirubinspiegels von

17,5 ± 1,8 mg/dl auf 7,5 ± 1,5 mg/dl. Beim Standardverfahren SPAD (ohne zusätzliche Pumpe zur Rezirkulation bzw. mit dem Tempo der Rezirkulation von 0 ml/min) wurde eine Reduktion der Bilirubinkonzentration von 17,4 ± 0,4 auf 8,8 ± 0,6 mg/dl beobachtet.

Als Markersubstanz für die bei Leberversagen klinisch bedeutsamen wasserlöslichen Toxine wurde Ammoniak gewählt. Die Ammoniakkonzentration wurde durch SPAD (Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe 0 ml/min) von 244,8 ± 67,6 mg/dl auf 19,6 ± 12,9 mg/dl reduziert. Bei der OLAD-Variante mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min sank der Ammoniakspiegel von 214,7 ± 34,3 mg/dl auf 24,2 ± 8,7 mg/dl. Mit 180 ml/min konnte eine Abnahme der Ammoniakkonzentration von 245,7 ± 36,5 mg/dl auf 36,3 ± 13,7 mg/dl erreicht werden und mit 270 ml/min von 237,2 ± 38,5 mg/dl auf 22,4 ± 8,4 mg/dl.

Zur Analyse der Versuchsergebnisse wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Es wurde kein statistisch signifikanter Einfluss der partiellen Rezirkulation der albuminhaltigen Dialysatlösung hinsichtlich der Eliminierung der albumingebundenen und der wasserlöslichen Toxine auf das Detoxifizierungspotenzial der SPAD festgestellt.

Summary

This study is based on the assumption that the costly human albumin is not completely used during Single Pass Albumin Dialysis (SPAD) and is largely rejected. In order to verify this hypothesis, an additional pump was connected to the filtration line and the dialysate line to partially recirculate the dialysis solution that had already passed through the filter. In contrast to the commercially obtainable MARS® system, the dialysate solution containing the albumin is not cleaned after passing through the filter; part of it is rejected immediately afterwards and part of it after renewed circulation. Four series of experiments with the additional pump operating at three different speeds (180 ml/min, 270 ml/min, 90 ml/min) were carried out. 2000 ml of plasma, which was full of toxins, were detoxified for 6 hours using the various setup modes in the OLAD (Open Loop Albumin Dialysis) system for each experiment (number of experiments = 4 per setup mode) during this in vitro study. All the experiments were performed using the CVVHDF configuration. The concentrations of ammonia, creatinine, urea, uric acid, albumin, protein and bilirubin were set in order to assess the detoxification capacity. The samples were obtained

before the start of the experiment and at particular time intervals. Bilirubin was selected as the marker for albumin-bonded substances and it was reduced from 16.5 ± 0.9 mg/dl to 8.0 ± 1.3 mg/dl through the OLAD mode when the speed of the recirculation pump was set at 90 ml/min. It was possible to reduce the concentration of bilirubin from 17.2 ± 0.4 mg/dl to 9.5 ± 0.8 mg/dl by setting the speed of the recirculation pump to 180 ml/min. By increasing the recirculation speed to 270 ml/min, it was possible to reduce the bilirubin level from 17.5 ± 1.8 mg/dl to 7.5 ± 1.5 mg/dl. A reduction in the concentration of bilirubin from 17.4 ± 0.4 to 8.8 ± 0.6 mg/dl was observed within the standard SPAD procedure (i.e. without any additional pump for recirculation purposes or with the recirculation speed set at 0 ml/min).

Ammonia was selected as the marker for the water-soluble toxins that are clinically significant during liver failure. The concentration of ammonia was reduced from 244.8 ± 67.6 mg/dl to 19.6 ± 12.9 mg/dl using SPAD (the speed of the recirculation pump was 0 ml/min). Using the OLAD option and the recirculation pump speed set at 90 ml/min, the ammonia level fell from 214.7 ± 34.3 mg/dl to 24.2 ± 8.7 mg/dl. If the speed was doubled to 180 ml/min, it was possible to reduce the concentration of ammonia from 245.7 ± 36.5 mg/dl to 36.3 ± 13.7 mg/dl and, if the speed was increased to 270 ml/min, from 237.2 ± 38.5 mg/dl to 22.4 ± 8.4 mg/dl.

An analysis of variance was used to analyse the results of the experiments. The partial recirculation of the dialysate solution containing albumin did not offer any statistically significant effect for the detoxification potential of SPAD when eliminating albumin-bonded and water-soluble toxins.

1 Einleitung

Die Behandlung des akuten Leberversagens (ALV) sowie der akuten Dekompensation einer chronischen Lebererkrankung (ADCL) beinhaltet die Substitution der Funktionen einer insuffizienten Leber und die Bekämpfung der sekundären extrahepatischen Komplikationen. Die metabolischen Funktionen sowie Syntheseleistungen der Leber können bis zu einem gewissen Ausmaß durch konventionelle, intensivmedizinische Therapie ersetzt werden. Allerdings kann die Entgiftungsfunktion der Leber gegenwärtig nur durch extrakorporale Leberunterstützungssysteme ersetzt werden [1-4]. Die extrakorporalen Leberersatzsysteme

lassen sich in artifizielle und biologische (bzw. zellbasierte) Verfahren einteilen. In den meisten Fällen des ALV und ADCL stellt eine orthotope Lebertransplantation die einzige kurative Therapiemöglichkeit dar. Der klinische Einsatz eines Leberersatzverfahrens im intensivmedizinischen Bereich kann die Wartezeit bis zur Verfügbarkeit eines geeigneten Organs („Bridging“) oder sogar eine natürliche Regeneration ermöglichen. Die meisten Systeme der Leberunterstützung benutzen humanes Albumin als Toxinbinder, welches in der Leber synthetisiert wird. Diese Art von Systemen basiert auf klassischer Dialyse und ist dadurch am einfachsten verwendbar. Die Nutzung des Albumins ist sehr kostenintensiv dadurch ein limitierender Faktor hinsichtlich der Anwendung der Leberunterstützung.

Das Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Überprüfung der Hypothese, dass das Albumin in einem extrakorporalen Kreislauf eines artifiziellen Leberunterstützungssystems nicht komplett verwendet wird. Das Ziel unserer Studie, welche experimentell durchgeführt wurde, war die Untersuchung vom Einfluss der Rezirkulation der albuminhaltigen Lösung im extrakorporalen Kreislauf auf die Entgiftungskapazität eines Leberunterstützungssystems (in diesem Fall SPAD: Single Pass Albumin Dialyse), in welchem Albumin nach einmaliger Passage des Dialysates verworfen wird. Des Weiteren versuchten wir durch unsere In-vitro-Studie zur Komplettierung der aktuellen Datenlage hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit sowie der Wirtschaftlichkeit der extrakorporalen Leberunterstützung beizutragen.

1.1 Das akute Leberversagen

Das akute Leberversagen (ALV) ist ein multifaktorielles, klinisches Syndrom mit schwerer Leberfunktionsstörung, einhergehend mit Koagulopathie, Enzephalopathie und Ikterus bei Patienten ohne vorbestehende Lebererkrankung. Definitionsgemäß entwickelt sich beim akuten Leberversagen die Enzephalopathie innerhalb von acht Wochen nach Auftreten der ersten Symptome bei einem Patienten ohne hepatische Vorerkrankung. Einige Autoren beschreiben allerdings den Beginn der Enzephalopathie beim ALV im Zeitintervall von ein bis zwei Wochen oder sogar bis zu sechs Monaten nach ersten klinischen Manifestationen. Andere Definitionen beziehen sich auf den Zeitraum vom Auftreten eines Ikterus bis zur Entwicklung einer Enzephalopathie, sind aber nicht allgemeingültig. Ein subakutes Leberversagen definiert sich als progressive, hepatische Dysfunktion, welche sich über eine längere Zeit bis zu etwa einem halben Jahr entwickelt und zeigt eine ähnliche Klinik wie bei ALV, jedoch mit einer schlechteren Prognose [5].

In den USA erkranken jährlich etwa 2000 Menschen an einem ALV, die Mortalität ohne Lebertransplantation erreicht annähernd 80 % [2].

In Deutschland beträgt die Anzahl der Patienten mit ALV ungefähr 100 bis 150 Fälle pro Jahr [5, 6].

Tabelle 1 Zuordnung von Klassifikation und Ätiologie des Leberversagens (modifiziert nach O’Grady und Williams) [7]

	hyperakut	akut	subakut
Zeitspanne zwischen Einsetzen von Ikterus und hepatischer Enzephalopathie	0-7 Tage	1-4 Wochen	1-6 Monate
Ätiologie	Intoxikationen (Paracetamol, Amanita phalloides), HAV, HBV	HBV Arzneimittelreaktionen	NANB

1.1.2 Akute Dekompensation einer chronischen Lebererkrankung

Die akute Dekompensation einer chronischen Lebererkrankung (ADCL) wird als eine akute Verschlechterung der Leberfunktion bei Patienten mit einer bekannten, zuvor kompensierten, chronischen Lebererkrankung definiert. Häufig tritt eine Verschlechterung der Leberfunktion in Zusammenhang mit einem auslösenden Faktor wie einer akuten, gastrointestinalen Blutung, übermäßigem Alkoholkonsum, schwerwiegender Infektion oder Sepsis auf.

Einige Autoren unterscheiden zwischen Leberversagen bei Patienten im Endstadium chronischer Leberkrankheiten und Leberversagen durch akute Dekompensation einer chronischen Lebererkrankung. Der Hauptunterschied zwischen ihnen ist das Vorhandensein oder Fehlen eines auslösenden Ereignisses. ADCL bezieht sich auf eine akute Verschlechterung der Leberfunktion und anschließend der Funktionen anderer Organe nach einem auslösenden Ereignis (z. B. Varizenblutung) bei einem Patienten mit zuvor gut kompensierter, chronischer Lebererkrankung. Während ALV und ADCL potentiell reversibel sind, ist das Leberversagen im Endstadium einer chronischen Lebererkrankung irreversibel [4].

1.2 Die Ätiologie des akuten Leberversagens

Die Ätiologie eines akuten Leberversagens ist mannigfaltig. Es werden auch geographische Unterschiede beschrieben. In Deutschland etwa sind Virushepatitiden und toxische Medikamentennebenwirkungen bzw. Medikamentenvergiftungen die häufigsten Ursachen für die Entstehung eines ALV (siehe Tbl. 1), in Großbritannien steht die Paracetamolvergiftung im Vordergrund [8-10], und der häufigste Auslöser eines akuten Leberversagens in den Mittelmeerländern ist die Hepatitis B [9]. Idiosynkratische Medikamentenreaktionen können gegen oft als harmlos eingestufte Kräutereextrakte auftreten und wurden zum Beispiel nach der Einnahme von traditionellen chinesischen Präparaten, Johanniskraut oder Kava-Kava dokumentiert [8]. Es gibt Hinweise darauf, dass der Konsum von grünem Tee in seltenen Fällen zur Leberschädigung führen kann [11]. Auch Drogenkonsum (insbesondere Ecstasy) und die möglicherweise damit verbundene Zufuhr toxischer Lösungsmittel kann schwerste Leberschäden verursachen [9]. Die antiretrovirale Therapie bei HIV-Patienten ist auch ein möglicher Auslöser für die Entwicklung eines Leberversagens. Als seltenere Ursachen sind die Knollenblätterpilzvergiftung, Morbus Wilson, das Budd-Chiari-Syndrom und Schwangerschaftsleber zu nennen [9, 12, 13]. Bei ca. 20-40% der Fälle lässt sich keine spezifische Ätiologie eruieren (kryptogenes akutes Leberversagen). Laut aktuellen Daten kann in ca. 1/5 dieser Fälle durch die Bestimmung von Paracetamol-Protein-Komplexen im Serum eine nicht diagnostizierte Paracetamolüberdosierung nachgewiesen werden [14, 15].

Die vor Kurzem publizierten Ergebnisse aus einer retrospektiven Studie im Zeitraum von 2002-2008 bezüglich der Ätiologie des ALV im Ruhrgebiet in Deutschland stimmen den mit entsprechenden Daten aus den USA überein [9, 10, 16, 17]. Laut dieser Studie sind die häufigsten Ursachen für ein ALV in Deutschland Medikamententoxizität (39,6 %), virale Hepatitiden (23,1 %) oder heterogene Ursachen (16,4 %) [17].

In den USA verursachen Paracetamolvergiftungen und idiosynkratische Medikamentenreaktionen mit 39 % und 13 % die Mehrzahl der Fälle des ALV. Vermutlich spielen auch genetische, immunologische und ökologische Faktoren in der Pathogenese von arzneimittelinduziertem Leberversagen eine wichtige Rolle. Eine durch Paracetamol induzierte Leberschädigung ist dosisabhängig und meistens durch eine unbeabsichtigte Überdosierung

(ca.7,5 g/Tag) verursacht. Ein ALV kann bei Alkoholikern durch die Einnahme von Paracetamol in der Dosierung von weniger als 4 g/Tag hervorgerufen werden [18, 19].

Die Recherche der „Acute Liver Failure Study Group“, bei welcher die Daten zwischen 1998 und 2007 in den USA erhoben wurden (insgesamt 1147 Patienten aus 23 Zentren), ergab als führende Ursachen eine Paracetamol-Überdosierung in 39 %, eine idiopathische Ätiologie in 17 %, eine idiosynkratische Medikamentenreaktion in 13 % und die akute Hepatitis A oder B in 12 % aller Fälle des Leberversagens. In 67 % aller Fälle waren Frauen betroffen und das durchschnittliche Alter betrug 38 Jahre (17-79 Jahre). Die Inzidenz der Paracetamolüberdosierung als Ursache des ALV erhöhte sich in den letzten neun Jahren, bei etwas rückläufiger Tendenz des ALV, verursacht durch virale Hepatitiden [20-22].

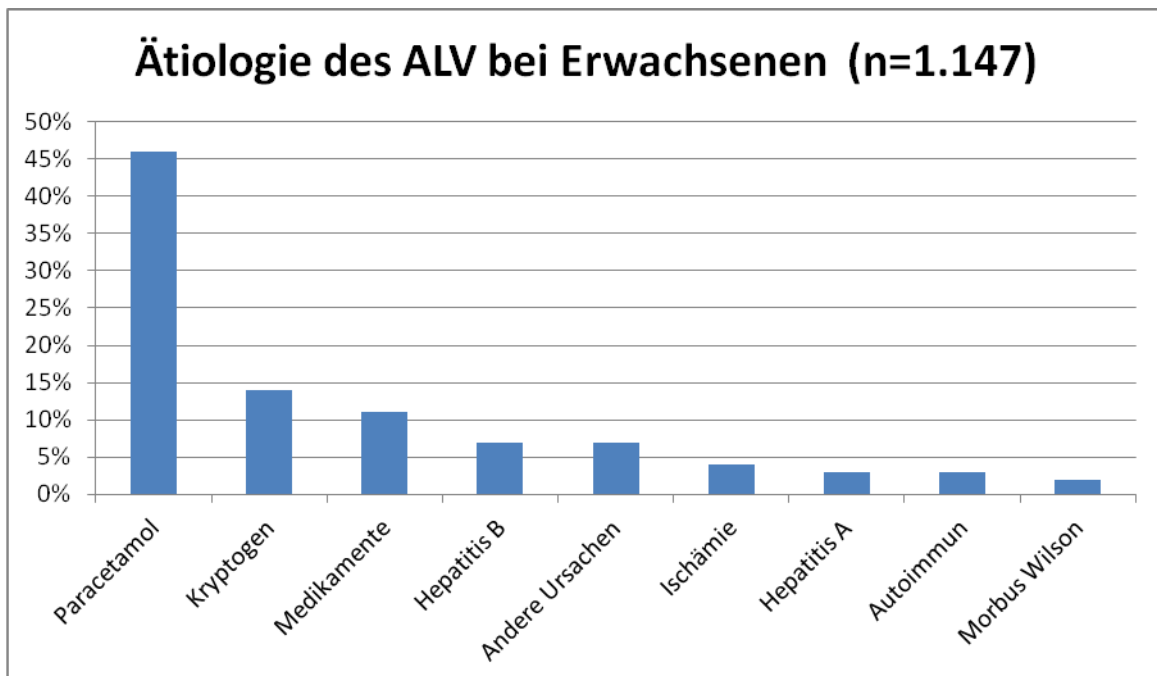


Abbildung 1 Ätiologie des ALV bei Erwachsenen (modifiziert nach William M. Lee et al.) [22].

Laut den Angaben der pädiatrischen „Acute Liver Failure Study Group“ (organisiert im Jahr 2000, besteht aus 19 klinischen Zentren in den Vereinigten Staaten (n = 16), Kanada (n = 1), und UK (n = 2)) ist die häufigste Ätiologie des ALV bei den Kindern eine Paracetamolüberdosierung mit 12 % der Fälle, gefolgt von metabolischen Ursachen in ~ 10 % der Fälle, viralen Hepatitiden ~ 6 %, Ischämie ~ 4 %, idiosynkratische arzneimittelinduzierte Leberschädigung ~ 4 % und andere Ursachen mit 15 % der Fälle, in 49 % war die Ursache unklar. Die Verteilung der Ätiologie unterscheidet sich von Erwachsenen und ist auch vom Alter abhängig. Bei den älteren

Kindern sind Paracetamolüberdosierung und Morbus Wilson die häufigsten Ursachen des Leberversagens. Es gab keine Hepatitis-B-induzierten Fälle, n = 1 Hepatitis C, n = 5 Hepatitis-A-Fälle, n = 11 Herpes simplex Virus, n = 7 Epstein-Barr-Virus und jeweils n = 1 Adenovirus-, Enterovirus-, Paramyxovirus-, Influenza-A-Infektionen [22-25].

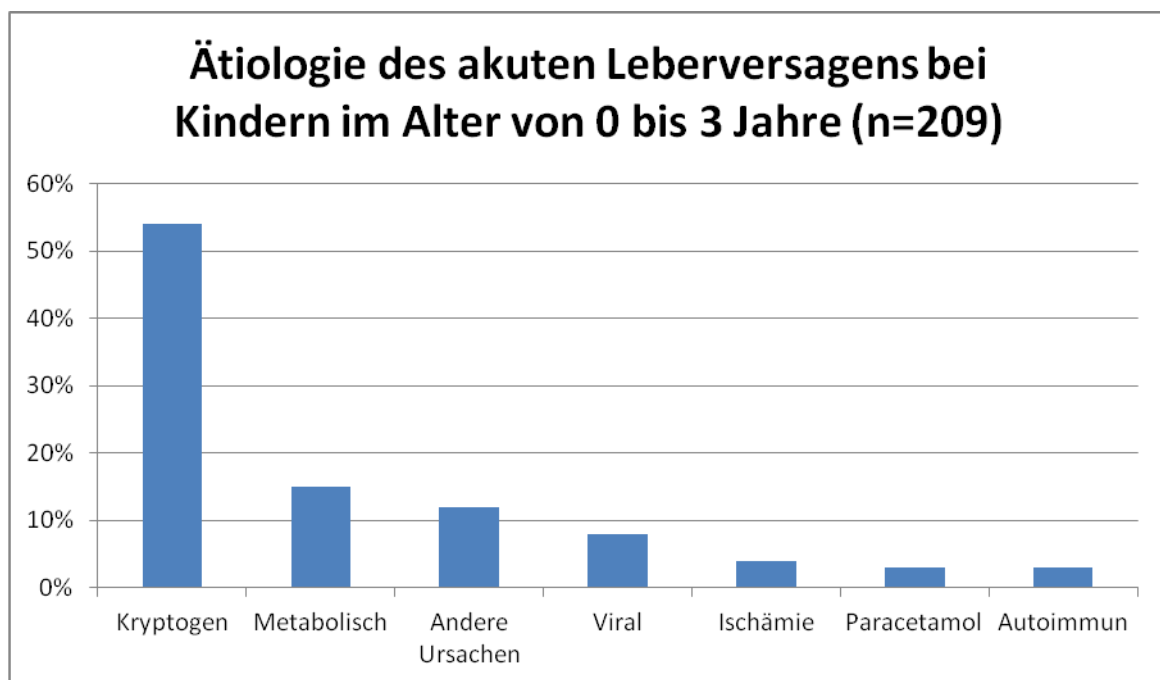


Abbildung 2 Ätiologie des ALV bei Kindern im Alter von 0 bis 3 Jahren (modifiziert nach William M. Lee et al.) [22].

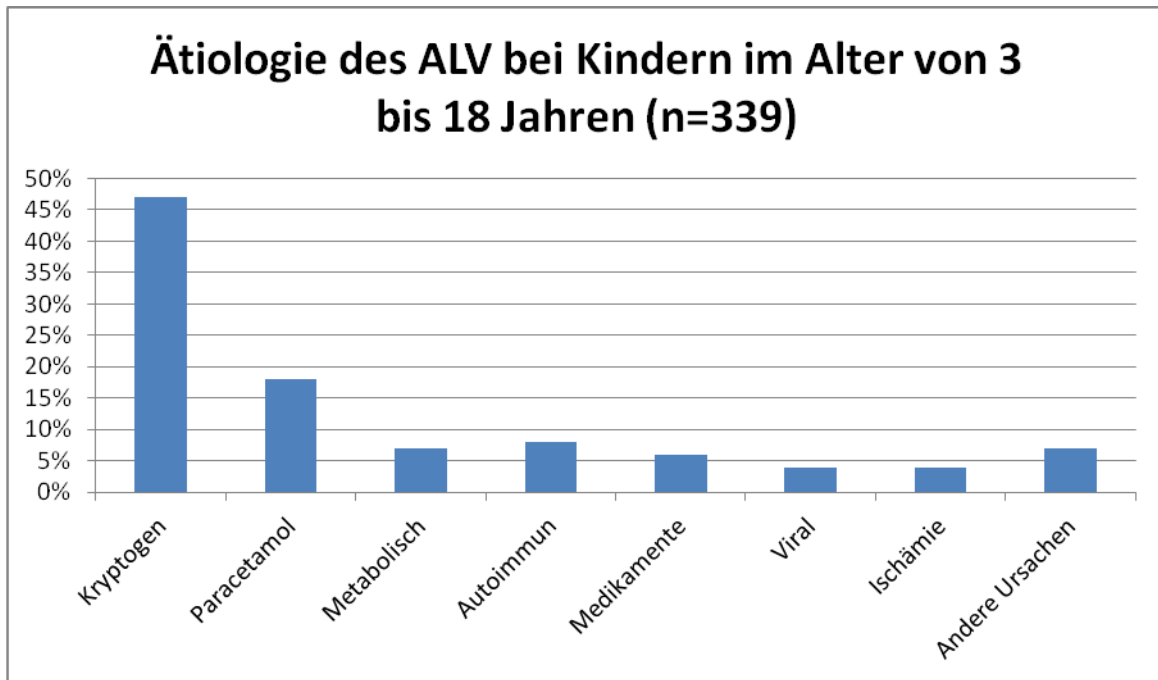


Abbildung 3 Ätiologie des ALV bei Kindern im Alter von 3 bis 18 Jahren (modifiziert nach William M. Lee et al.) [22].

Tabelle 2 Ätiologie des akuten Leberversagens (modifiziert nach Boker, K.H.) [6].

Virale Ätiologie	Toxische Genese/Idiosynkrasie	Sonstige Ursachen
Akute Hepatitis A Akute Hepatitis B (mit oder ohne Delta- Superinfektion) Akute Hepatitis C Akute Hepatitis E Andere Viren: HSV, HHV-6, CMV, VZV, Parainfluenza	Paracetamol-Überdosierung Halogenierte Kohlenwasserstoffe, Halothan, Isofluran, Enfluran Idiosynkratische Reaktionen: INH, Rifampicin, NSAR, Sulfonamide Tetracycline, Ketonazol, MAO- Hemmer, trizyklische Antidepressiva, Allopurinol, Valproinsäure, Marcumar, Tetrachlorkohlenstoff	Amantadin- Intoxikation Akute Schwangerschaftsleber Reye-Syndrom Autoimmunhepatitis Morbus Wilson Budd-Chiari-Syndrom Hyperthermie Sepsis

Tabelle 3 Liste von Medikamenten, die ein ALV induzieren können (modifiziert nach Pathikonda, M. et al.) [19].

Hauptgruppen	Präparat
Analgetika / Antipyretika / Narkosemittel	Acetaminophen Aspirin Halothan
Antimykotika	Isoniazid Rifampicin Ethambutol Streptomycin Pyrazinamid
Antibiotika	B-Lactam-Antibiotika Clavulansäure Tetracycline Makrolide Sulfonamide
Antimykotika	Ketoconazol, Itraconazole, Fluconazol
Antiepileptika	Carbamazepin, Felbamat, Lamotrigin, Oxcarbazepin, Phenobarbital, Phenytoin, Valproinsäure, Vigabatrin
Drogen	Marihuana, Haschisch, Kokain, Amphetamine
Schlankheitsmittel	Ma huang, Usninsäure, Chaso, Onschido
Weitere Medikamente	Lisinopril, Disulfuran, Amiodaron, Metformin, Diclofenac, Nikotinsäure, Labetalol, Imipramin, Etoposid, Flutamide, Tolcapon, Allopurinol, Methyldopa, Gemtuzumab

1.3 Pathophysiologie des Leberversagens

Die pathophysiologischen Mechanismen eines Leberversagens (ALV und ADCL) sind bei den einzelnen Krankheiten unterschiedlich, das klinische Erscheinungsbild ist jedoch von der Genese des Leberversagens relativ unabhängig.

Im Grunde genommen kommt es beim ALV zum Parenchymverlust und folglich zur Verschlechterung aller Leberfunktionen, unter anderem der Synthese- und Entgiftungsfunktion sowie der metabolischen Funktion.

Zusammengefasst kommt es beim ALV zur klinischen Manifestation durch die Freisetzung toxischer Metaboliten aus dem zerstörten Lebergewebe, die metabolischen Veränderungen aufgrund Verlustes der funktionsfähigen Leberzellmasse sowie die verminderte Fähigkeit der verbliebenen Leberanteile zur Regeneration.

Die Regenerationsfähigkeit der Leber im Falle eines ALV ist von der Ätiologie des Leberversagens sowie vom Alter und von Vorerkrankungen des Patienten abhängig [9].

Die pathophysiologischen Mechanismen der Entwicklung einer Multiorgandysfunktion beim akuten Leberversagen sind noch nicht vollständig erforscht. Laut der „Toxinhypothese“ kommt es zur Akkumulation der Toxine und als Folge zum verminderten Lebermetabolismus, vor allem der Detoxifikation.

Das Ammoniak, Produkte des Proteinabbaus (aromatische Aminosäuren, Tryptophan, Indol, Merkaptan, Phenol) und endogene Benzodiazepine sind in die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie involviert. Stickstoffmonoxyd und Prostanoiden spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese einer kardiovaskulären und renalen Dysfunktion.

Die meisten Toxine (außer Ammoniak) sind nicht wasserlöslich und können deshalb durch eine konventionelle Dialyse nicht entfernt werden.

Eine eingeschränkte Glukoneogenese und Glykogenolyse in der Leber führt zum erhöhten Risiko einer Hypoglykämie. Die verminderte Synthese von Blutgerinnungsfaktoren kann zu bedrohlichen Gerinnungsstörungen führen [26].

Mikroskopisch zeigen sich konfluierende Nekrosen sowie ein Verlust an Hepatozyten, welche das Leberläppchen überschreitet. Eine Biopsie der Leber ist bei ALV häufig wenig aussagekräftig, weil diese weder die genaue Genese klären kann, noch eine zuverlässige Aussage über die Spontanprognose ermöglicht. Das Risiko einer Biopsie der Leber bei ALV kann größer

sein als ihr potenzieller Nutzen. Eine prognostische Bedeutung der Quantifizierung der Nekrosen konnte nicht nachgewiesen werden [6].

Die genauen Mechanismen, die von einer kompensierten Leberzirrhose zur Entwicklung einer akuten Dekompensation einer chronischen Lebererkrankung führen, sind komplexer und können nicht allein durch die Toxinhypothese erklärt werden. Die Prognose des ADCL ist vom auslösenden Faktor sowie von der zugrunde liegenden Lebererkrankung abhängig. Einige Autoren unterscheiden zwei verschiedene Varianten des ADCL: ADCL-Typ-I, welcher auf dem Boden einer kompensierten Leberzirrhose durch eine Hepatitis, chirurgische Eingriffe oder Infektion ausgelöst werden kann; ADCL-Typ-II, welcher auf dem Boden einer dekompensierten Leberzirrhose entsteht und durch eine Infektion oder Blutung ausgelöst wird. ADCL-Typ-I entwickelt sich rasch, aber potentiell reversibel, und die Patienten von diesem Typ des Leberversagens profitieren unter anderem von der extrakorporalen Leberunterstützung. Die klinische Manifestation des ADCL-Typ-II ist langsam, allerdings irreversibel. Solche Patienten profitieren wenig von der Leberunterstützungstherapie. Die 3- Monate-Überlebensrate der Patienten mit ADCL-Typ-II ist mit 80 % deutlich höher als bei den Patienten des Typs-I-ADCL [27].

Eine wichtige Rolle in der Entwicklung von ADCL spielt eine bakterielle Translokation, welche mit einer verminderten Immunabwehr einhergeht. Die Letzte wird durch eine verminderte Opsonisierung infolge gestörter Syntheseleistung der Leber bei Patienten mit Zirrhose verursacht. Die Opsonisierung ist erforderlich für die suffiziente antibakterielle Aktivität der Immunzellen, wie z.B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Eine portale Hypertension bei Leberzirrhose führt zur Ausbildung der portokavalen Anastomosen, dadurch werden bakterielle Produkte wie Endotoxine und Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor- α) nicht suffizient eliminiert. Persistierende Bakteriämie und erhöhte Konzentration von Endotoxinen und Zytokinen sind auslösende Faktoren für die Entwicklung einer systemischen entzündlichen Reaktion im Sinne einer Sepsis oder SIRS (Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom). Gleichzeitig kommt es aufgrund der hyperdynamen Kreislaufregulation bei Patienten mit Leberzirrhose zur verminderten Perfusion der Organe. Die hieraus resultierende Ischämie führt zur Organdysfunktion, wie z.B. zum hepatoralen Syndrom oder zur hepatischen Enzephalopathie und am Ende zum Multiorganversagen [28, 29].

1.4 Inzidenz und Mortalität des akuten Leberversagens

In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Inzidenz des akuten Leberversagens ungefähr 100-150 Erkrankungsfälle pro Jahr [26]. Die Häufigkeit von ALV in den USA ist schätzungsweise 2.000 bis 2.800 Fällen pro Jahr [20, 22].

Trotz optimaler intensivmedizinischer Therapie ist die Prognose der Patienten, abhängig von ihrem Lebensalter und der Ätiologie der Grunderkrankung, immer noch schlecht. Die Überlebensquote beim akuten Leberversagen beträgt bei konservativer Therapie ohne Lebertransplantation (LTX) von 10 % bis 40 %, nach LTX liegt die Ein-Jahres-Überlebensquote bei 70 % [16, 22].

Die häufigsten Todesursachen bei ALV sind Hirnödem und Sepsis [16].

1.5 Die extrahepatischen Komplikationen

Die extrahepatischen Komplikationen sind die prognosebestimmenden Faktoren beim Leberversagen [30].

1.5.1 Kreislaufversagen

Im Rahmen des ALV kommt es zur peripheren Vasodilatation mit einer konsekutiven Hypovolämie. Das Herzzeitvolumen ist erhöht, die vaskulären Füllungsdrucke sind niedrig (ZVD, PAP, PCWP). Der relative Volumenmangel spielt eine wichtige Rolle bei der Genese eines akuten Nierenversagens. Komplizierend kommt hinzu, dass bei der Entwicklung von Hirndruck der arterielle Blutdruck ansteigen kann.

1.5.2 Das hepatorenale Syndrom

Das hepatorenale Syndrom (HRS) wird als eine Entwicklung der funktionellen Niereninsuffizienz bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung definiert. Die Niereninsuffizienz im Rahmen des hepatorenalen Syndroms (HRS) ist prinzipiell reversibel. Die pathophysiologische Grundlage des HRS ist eine renale Vasokonstriktion bei systemischer Kreislaufdysregulation. Das HRS unterscheidet sich von einer Niereninsuffizienz bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose durch fehlende renale morphologische Veränderungen. Es werden zwei Typen eines HRS unterschieden: Typ I ist eine akut verlaufende Form des HRS mit Sterberate von 80 % innerhalb von zwei Wochen; HRS Typ II ist eine chronische Form, welche sich über Wochen und manchmal über Monate bei den Patienten mit Leberzirrhose mit dem therapierefraktären Aszites entwickeln kann. Typ I HRS unterscheidet sich laborchemisch vom Typ II durch einen deutlichen Kreatininanstieg auf $> 226 \mu\text{mol/l}$ ($> 2,5 \text{ mg/dl}$) und durch einen schnellen Abfall der Kreatinin-Clearance auf $< 20 \text{ ml/min}$. Bei HRS Typ II ist dagegen nur ein moderater Kreatininanstieg zu verzeichnen ($133\text{-}226 \text{ mmol/l}$). Für die Diagnosestellung eines HRS ist der Ausschluss anderer Ursachen für die Niereninsuffizienz erforderlich. Dafür sind folgende diagnostische Kriterien des „International Club of Ascites“ nützlich [31]:

- Vorhandensein einer Leberzirrhose mit Aszites,
- Serumkreatinin $> 1,5 \text{ mg/dl}$ ($> 133 \text{ mmol/l}$),
- keine signifikante Besserung des Serumkreatinin auf Werte $\leq 1,5 \text{ mg/dl}$ nach mindestens 48 Stunden Karenz der Diuretika und Volumenexpansion mit Albumin. Die empfohlene Albumindosierung beträgt $1 \text{ g/kg Körpergewicht/Tag}$ bis maximal 100 g/Tag .
- Ausschluss der Schocksymptomatik,
- keine Therapie mit nephrotoxischen Medikamenten,
- Ausschluss einer parenchymatösen Nierenerkrankung (keine Proteinurie $> 500 \text{ mg/Tag}$, keine Mikrohämaturie $> 50 \text{ Erythrozyten/HPF}$ und unauffälliger Nierenultraschall).

Die Pathophysiologie des HRS wird am häufigsten durch eine Vasodilatationstheorie erklärt. Ausschlaggebend für die Genese eines HRS Typ II ist die portale Hypertension oder eine

schwere Kreislaufdysfunktion mit vermindertem Herzzeitvolumen bei den Patienten mit dem HRS Typ I [32]. Es kommt zur Erhöhung der Konzentration der vasodilatierenden Substanzen (Stickstoffmonoxid, Kohlenmonoxid, Prostaglandine und vasodilatorische Peptide), was zu einer Vasodilatation im Splanchnikusgebiet und konsekutiven Eröffnung von portosystemischen Shunts führt. Die Volumenverschiebung in das Splanchnikusgebiet führt zu einer relativen Hypovolämie mit konsekutiver Minderdurchblutung der Nieren und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und des sympathischen Nervensystems. Der Anstieg der Aktivität der Vasokonstriktoren führt letztendlich zur Entwicklung eines HRS. Die positive Auswirkung der Therapie mit Vasokonstriktoren (Terlipressin) stützt in gewissem Maße die Vasodilatationshypothese der Entwicklung von HRS [33, 34]. Aktuelle S3-AWMF-Richtlinien zur Behandlung von HRS besagen, dass die extrakorporale Albumindialyse keinen Einfluss auf Nierenfunktion und Überleben bei Patienten mit HRS hat. Leberersatzverfahren sollen deshalb bei Patienten mit HRS nur im Rahmen kontrollierter Studien zum Einsatz kommen. Eine Nierenersatztherapie wird allerdings bei Vorliegen von Dialysekriterien zum Bridging bis zur Lebertransplantation empfohlen.

1.5.3 Hepatische Enzephalopathie und Hirnödem

Eine hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine funktionelle, metabolische Störung des zentralen Nervensystems im Rahmen einer chronischen oder akuten Lebererkrankung. Es werden drei Typen der hepatischen Enzephalopathie unterschieden:

Typ A – HE im Rahmen eines akuten Leberversagens;

Typ P – HE als Folge eines portosystemischen Shunts ohne das Vorliegen einer hepatozellulären Erkrankung;

Typ C – HE auf dem Boden einer Leberzirrhose und portaler Hypertension. Typ C – HE wird in die episodische HE, persistierende HE und minimale hepatische Enzephalopathie unterteilt.

Bei fehlender oder mangelhafter Entgiftungsfunktion der Leber kommt es zur Akkumulation der Neurotoxine Ammoniak, aromatische Aminosäuren, Mercaptane, Phenolderivate, kurz- und mittelkettige Fettsäuren, γ -Aminobuttersäure (GABA). Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wird durch gestiegene Konzentrationen von Ammoniak, Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IL-6) und Endotoxinen verändert.

Eine erhöhte Ammoniakkonzentration induziert vermehrte Glutaminsynthese in den Astrozyten und als Folge dessen eine Schwellung, was zu einem Hirnödem führen kann. Bei der Progression des Hirnödems kann es letztendlich zu einer Herniation des Hirnstammes kommen. Ein erhöhter intrakranieller Druck und das Hirnödem gehören zu den häufigsten Todesursachen im Rahmen eines ALV. Erhöhte Konzentrationen von Neurotoxinen führen zu den Veränderungen der Synthese von exzitatorischen (Glutamat, Aspartat) und inhibitorischen Neurotransmittern (GABA) und der Expression ihrer Rezeptoren. Dabei führt ein Überschuss von inhibitorischen Neurotransmittern zur konsekutiven Neurodepression [35].

Überdies besteht bei den Patienten mit HE ein Ungleichgewicht zwischen den aromatischen und verzweigkettigen Aminosäuren. Die relative Konzentrationserhöhung von aromatischen Aminosäuren (Tyrosin und Phenylalanin) aufgrund einer verminderten hepatischen Elimination führt zu einer Verhinderung der Hydroxylierung von Tyrosin zu Levedopa und zu konsekutivem Konzentrationsabfall von Dopamin und Noradrenalin. Gleichzeitig steigt die Synthese von sogenannten „falschen Neurotransmittern“ (β -Phenylethanolamin und Octopamin). Das Verhältnis zwischen verzweigkettigen und den aromatischen Aminosäuren korreliert mit dem Schweregrad der HE [36].

Die führende Rolle in der Pathogenese einer HE wird dem Ammoniak zugeschrieben aufgrund der Tatsache, dass bei ca. 90 % der Patienten mit einer HE eine erhöhte Ammoniakkonzentration vorliegt. Darüber hinaus korreliert eine Senkung der Ammoniakkonzentration mit der Verbesserung der klinischen Symptomatik. Allerdings liegen bei ca. 10 % der Patienten normale Ammoniakkonzentrationen vor. Andere Abbauprodukte wie Mercaptane und Phenole können offensichtlich die neurotoxischen Effekte des Ammoniaks potenzieren.

Morphologisch beobachtet man im Rahmen einer akuten HE eine Gliaschwellung. Diese konnte unter anderem durch eine Protonen-MR-Spektroskopie nachgewiesen werden [37]. Histologisches Korrelat einer chronischen hepatischen Enzephalopathie ist eine Alzheimer-Typ-II-Degeneration der Astrozyten.

Die Schweregradeinteilung des mentalen Zustands bei HE erfolgt regelhaft nach den West-Haven-Kriterien [38]:

Stadium I

Leichte mentale Verlangsamung

Euphorie oder Angst

Verminderte Aufmerksamkeit

Schwierigkeiten bei Addition

Stadium II

Lethargie oder Apathie

Minimale Desorientierung zu Zeit und Ort

Diskrete Persönlichkeitsveränderungen

Unangemessenes Verhalten

Schwierigkeiten bei Subtraktionsrechenleistung

Stadium III

Somnolenz bis Semistupor (Antwort auf verbale Stimuli möglich)

Verwirrtheit

Ausgeprägte Desorientierung

Stadium IV

Koma (ohne Antwort auf verbale oder Schmerzstimuli)

Bei allen Patienten mit einem ALV liegt mindestens eine HE ersten Grades vor. Die Prognose der HE bei ALV ist stadienabhängig. Die Patienten im Stadium III und IV haben mit einer Letalität von 80-85 % eine deutlich schlechtere Prognose als die Patienten in einem frühen Stadium (I-II). Bei weitgehender Therapieresistenz gegen konservative Maßnahmen werden Blutreinigungsverfahren und LT in Erwägung gezogen. Zahlreiche Studien berichten über einen positiven Einfluss der extrakorporalen Leberunterstützung auf die klinische Symptomatik der Patienten mit HE durch Verminderung der Konzentration der oben aufgeführten neurotoxischen Substanzen [36, 39-43].

1.6 Therapie des Leberversagens

Die Behandlung des Leberversagens beinhaltet ein Management des auslösenden Faktors (gastrointestinale Blutung, Infektion), intensivmedizinische Maßnahmen zur Prophylaxe und Therapie von Komplikationen, spezifische Therapiemaßnahmen für einige Ätiologien (N-Acetylcystein-Gabe bei Acetaminophenvergiftung, Verabreichung von Penicillin G und Silymarin als Antidot bei Amanita-Intoxikation, Prednisolon-Gabe beim Vorliegen einer Autoimmunhepatitis).

Das Prinzip der extrakorporalen Leberunterstützung (LUS) basiert auf der Toxin-Theorie der Entstehung eines Leberversagens, potenzieller Reversibilität des Versagens (bei ALV und ADCL) oder sogar der Möglichkeit einer partiellen oder vollständigen Regeneration der Leber. In den meisten Fällen verfolgen die Leberersatzverfahren das Ziel, die Leberfunktion vorübergehend zu unterstützen (sog. „Bridging“), bis ein passendes Organ zur Verfügung steht. Um einen Erkrankungsverlauf vorherzusagen und ggf. einen geeigneten Zeitpunkt für die Lebertransplantation (LTX) festzulegen, werden von den meisten Zentren daher verschiedene Kriterien für die Prognoseabschätzung (Model of End Stage Liver Disease (MELD), APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation sowie die Kings-College-Kriterien (KCC)) benutzt [3, 14, 37, 38].

Anders als beim ALV ist die LTX für chronische Lebererkrankungen die einzige kurative Therapieoption. Im Gegensatz zum ALV besteht im Falle einer chronischen Lebererkrankung meistens keine Option auf eine Notfalltransplantation, sodass die ADCL ein wichtiges Einsatzgebiet für Leberersatzverfahren darstellen könnte. Diese Verfahren sollen helfen, die hohe Mortalität dieser Patientengruppe zu reduzieren, damit diese die Wartezeit zur Transplantation (Monate bis Jahre) überstehen. Pharmakologische Behandlungen, welche den massiven Verlust einer Vielzahl an funktionsfähigen Hepatozyten in der Leber reduzieren und die Regeneration unterstützen könnten, sind noch nicht etabliert [44].

1.6.1 Die Entwicklung der extrakorporalen Leberunterstützung

Obwohl bereits mehrere Organersatzverfahren für die klinische Anwendung zur Verfügung stehen (z. B. Lungen- oder Nierenersatzverfahren), konnte sich bislang kein Leberersatzverfahren im klinischen Alltag durchsetzen. Angesichts der Vielzahl und Komplexität der Leberfunktionen (Synthese-, Entgiftungs-, Immun- und metabolische Funktion), erweist sich die Entwicklung eines maschinellen Leberersatzverfahrens als besondere Aufgabestellung für die Wissenschaftler.

Die Entwicklung der extrakorporalen Leberersatztherapie steht im engen Zusammenhang mit Hypothesen der Pathogenese des akuten Leberversagens. Die erste Hypothese ist die der kritisch funktionierenden Leberzellmasse (critical functioning liver cell mass hypothesis) und die zweite ist die Toxinhypothese. Die erste Hypothese basiert auf der Vermutung, dass die Anzahl der funktionsfähigen Leberzellen durch die Entzündung, Apoptose oder Nekrose reduziert wird. Daher können Synthese, Metabolismus und Detoxifikation nicht mehr suffizient ermöglicht werden. Die Immunfunktion, die durch die Kupffer-Zellen gewährleistet wird, wird von vielen Wissenschaftlern vernachlässigt [45].

Anhand der Toxinhypothese versucht man die Pathogenese des Leberversagens sowie die sekundäre Schädigung der Organsysteme durch die Exo- und Endotoxine zu erklären. Die logische Schlussfolgerung der Toxinhypothese für die Therapie des akuten Leberversagens wäre es, konsequenterweise die entsprechenden Toxine aus dem Körper zu entfernen [46-48].

Einige Arbeitsgruppen gingen von der Richtigkeit der Hypothese der kritisch funktionierenden Leberzellmasse „critical functioning liver cell mass“ aus. Mehrere Leberfunktionen sollten nun mit Hilfe von komplexen Lebergewebe- oder Leberzellsystemen ersetzt werden. Bereits in den sechziger Jahren wurde über Erfahrungen mit extrakorporaler Leberperfusion berichtet. Für diesen Zweck wurden neben humanen auch Primaten-, Schweine- und Kälberlebern verwendet [49-53]. Auch in den Sechzigern wurde über die Experimente mit der Kreuzzirkulation berichtet [54]. Diese Methode hatte neben dem Problem der Komplementaktivierung ein erhebliches Infektionsrisiko. Alle diese Methoden haben aus heutiger Sicht nur historische Bedeutung.

Eine neue Etappe der Entwicklung zellbasierter Leberersatzsysteme wurde mit sogenannten Bioreaktoren erreicht [55-57]. Zu den bekanntesten Bioreaktor-Konzepten gehört das ELAD-System („Extracorporeal Liver Assist Device“), welches von Sussman und Kelly entwickelt wurde. Das System benutzt C3A-Zellen (Subklon der HepG2), nämlich kultivierte Hepatomazellen [58, 59]. Demetriou entwickelte ein auf Schweinehepatozyten basierendes HepatAssist-System [55, 60]. Gerlach et al. konzipierten das MELS-System (Modular Extracorporeal Liver Support) [61, 62]. Die Universitäten Pittsburgh [63, 64] und Minnesota [65] sowie das Amsterdam Medical Center [66-68] konstruierten ebenso eigene zellbasierte Systeme.

Vielversprechend erscheint die Idee der Anwendung von adulten oder auch embryonalen Stammzellen in Bioreaktoren in absehbarer Zukunft [69-71]. Es wurde bereits von einer Differenzierung der Knochenmarkstammzellen zu Hepatozyten berichtet [72].

Die derzeit angewandten Leberunterstützungssysteme (LUS) lassen sich in zwei Gruppen einteilen: biologische/bioartifizielle und artifizielle LUS (siehe Tabelle 4).

1.6.2 Bioartifizielle Systeme

Das Prinzip der bioartifiziellen LUS ist eine Kombination der Entgiftungs- und Synthesefunktion. In den bioartifiziellen LUS werden allogene, xenogene Leberzellen oder Tumorzelllinien (z.B. HpG2, C3A) als biologische Komponente benutzt. Das Herzstück der meisten Systeme ist eine Kartusche mit Hohlfaserkapillaren, durch welche Patientenplasma geleitet wird. Im extrakapillaren Raum einer solchen Kartusche befinden sich Leberzellen. Der Transport von Nährstoffen, Metaboliten und Toxinen zwischen den Zellen und dem Patientenplasma erfolgt dabei mittels Diffusion über die semipermeable Membran, sodass kein direkter Kontakt zwischen dem Plasma und den Leberzellen stattfindet [73, 74]. Die Effizienz eines bioartifiziellen LUS ist von der Funktionsfähigkeit der Leberzellen sowie der Effektivität des Stoffaustauschs abhängig. Limitierende Faktoren für den Einsatz der LUS-Systeme sind technische Schwierigkeiten beim Aufbau sowie die geringe Verfügbarkeit der passenden Leberzellen. Die Benutzung der xenogenen Hepatozyten, welche unbegrenzt verfügbar sind, ist aufgrund der Gefahr von Zoonosen (z.B. porcine, endogene Retroviren (PERV)) und möglicher immunologischer Reaktionen momentan in Europa nicht zulässig. Die Funktionstüchtigkeit der immortalisierten Hepatozytenzelllinien ist deutlich geringer als bei normalen humanen Hepatozyten. Darüber hinaus besteht das Risiko, dass, wenn solche Zellen in den Körper eines Patienten (insbesondere unter Immunsuppression nach LTX) gelangen, sie dort zu Tumorentstehung führen können [57, 75-78].

ELAD

Im Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD) finden Zellen einer Tumorzelllinie (C3A) ihre Verwendung. Im primären Kreislauf wird kontinuierlich Plasma von zellulären Komponenten separiert und durch eine Reihe von Hohlfaser-Kartuschen mit den ELAD-C3A-Zellen (mit einer Gesamtzellmasse von 440 g) geleitet. Die Hohlfasern, bestehend aus einer semi-permeablen Membran, erlauben die Passage von in den C3A-Zellen synthetisierten Substanzen (Albumin, Gerinnungsfaktoren) in das Ultrafiltrat und gleichzeitig wird der Transport von Toxinen und Nährstoffen wie Glucose und Sauerstoff aus dem Ultrafiltrat zu den C3A-Zellen ermöglicht. Bis jetzt fehlen eindeutige Daten hinsichtlich der Wirksamkeit der Behandlung mit dem ELAD-System. Es wird berichtet über erfolgreiche Überbrückungen der Wartezeit bis zur Transplantation bei guter Verträglichkeit der Therapie und deutlicher Verbesserung der laborchemischen Parameter (z. B. Ammoniak, Bilirubin) [79, 80].

HepatAssist 2000

Das System wurde von Demetriou et al. entwickelt und besteht aus einem Hohlfasermembran-Bioreaktor mit 7×10^9 porcinen Hepatozyten im extracapillaren Raum. Nach Plasmaseparation im primären Kreislauf wird dieses anschließend im sekundären Kreislauf durch einen Aktivkohlefilter geleitet, danach erfolgt die Passage durch den Bioreaktor.

Es wurde über Verbesserungen der neurologischen Symptomatik, des intrakraniellen Druckes, des zerebralen Perfusionsdruckes sowie von Laborwerten (Transaminasen, Ammoniak) unter Behandlung mit diesem System in mehreren Studien berichtet [64, 81-83]. Die prospektive, randomisierte, multizentrische und kontrollierte Studie mit insgesamt 171 Patienten mit ALV (86 Kontrollgruppe und 85 Behandlungsgruppe) ergab einen positiven Effekt auf das 30-tägige Überleben der Patienten (71 % vs. 62 % der Kontrollgruppe) [60].

AMC-BAL

Das von Flendrig, Chamuleau et al. entwickelte AMC-BAL-System besitzt einen Hohlfasermembran-Bioreaktor mit 10^{10} porcinen Hepatozyten, in welchem das Plasma nach Separation im primären Kreislauf in direkten Kontakt mit den Hepatozyten kommt [84]. Das AMC-BAL-System wurde im Rahmen einer Phase-I-Studie mit 14 Patienten im ALV getestet. In

13 Fällen konnte eine Überbrückung der Wartezeit bis zu einer LTX erzielt werden. In einem Fall erholte sich die Leberfunktion, sodass eine LTX nicht mehr erforderlich wurde [68].

Aufgrund des Moratoriums für Xenotransplantationen werden derzeit Zellen der Hepatomzelllinie HepaRG™ statt porciner Hepatozyten im AMC-BAL-System benutzt. Die ersten Tierversuche mit Ratten mit ALV zeigten gesteigertes Überleben, verminderte Progression der Enzephalopathie, Besserung der Nierenfunktion sowie Reduktion der Ammoniakkonzentration [85].

MELS/BELS

Das BELS-System (Berlin Extracorporeal Liver Support) wurde von Gerlach et al. entwickelt. Das Kernstück des Systems ist ein Bioreaktor, bestehend aus drei in einander verwobenen und in ein Polyurethangehäuse integrierten Kapillarbündeln, welche der Plasmazirkulation, Nährmediumzufuhr und Oxygenierung dienen. Der Extracapillarraum wurde initial mit porcinen Hepatozyten besetzt. Im weiteren Verlauf wurden die porcinen Hepatozyten gegen primäre humane Hepatozyten ersetzt.

In einer klinischen Phase-I-Studie wurden 8 Patienten mit ALV behandelt. In allen 8 Fällen konnte eine Überbrückung der Wartezeit bis zur LTX erreicht werden. Das BELS-Konzept wurde weiterentwickelt und dem Bioreaktor (Cellmodule) wurde eine Dialyseeinheit (Detoxmodul für Single-Pass-Albumindialyse) zugefügt und so entstand das MELS-System (Modular Extracorporeal Liver Support). Mit einem MELS-System wurden weitere 12 Patienten behandelt [61, 86, 87].

1.6.3 Artificielle Leberunterstützung.

Die Anhänger der Toxinhypothese der Pathogenese des ALV propagieren die Ersetzung ausschließlich der Entgiftungsfunktion der Leber, die Synthese soll dabei medikamentös substituiert werden. Nach diesem Prinzip funktionieren die meisten heutzutage bekannten, im klinischen Arsenal befindlichen Leberunterstützungssysteme.

In den fünfziger Jahren kam zunächst die Hämodialyse für die Therapie des akuten Leberversagens zum Einsatz [88, 89]. Durch die Anwendung dieses Nierenersatzverfahrens konnte man die Senkung des Ammoniakspiegels erreichen und somit auch eine temporäre

Besserung der hepatischen Enzephalopathie. Die Entfernung der Substanzen mit mittlerem Molekulargewicht konnte erst nach Einführung der moderneren, synthetischen High-Cut-Off-Membranen anstatt der bis dahin üblichen Zellulose- und Cuprophanmembranen teilweise verbessert werden [90, 91]. Die Hämofiltration [92] und Hämodiafiltration [93] nutzen anstatt oder neben der Diffusion die Konvektion, um Substanzen aus dem Blut zu entfernen. Dies ermöglichte auch die Entfernung von Stoffen mit mittlerem Molekulargewicht. Leider konnten mithilfe dieser Techniken fast ausschließlich wasserlösliche Toxine entfernt werden, während albumingebundene Substanzen im Blut blieben [91].

Im weiteren Verlauf kamen solche Methoden wie Plasmapherese mit anschließendem Plasmaaustausch zum Einsatz [94]. Plasmapherese bleibt auch heutzutage eine der verbreitetsten Entgiftungsverfahren bei ALV [95-100]. Einige Autoren berichteten über eine geringgradige Verbesserung der neurologischen Symptomatik der behandelten Patienten im ALV [101, 102]. Dennoch konnte bis heute die Wirksamkeit der Plasmapherese mit anschließendem Plasmaaustausch für die Behandlung der Patienten mit Leberversagen nicht nachgewiesen werden [95]. Unter anderem besteht bei diesem Verfahren ein hohes Risiko einer Infektionsübertragung durch das Fremdplasma sowie die Gefahr von Arrhythmien, eines ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) und eines nicht-kardialen Lungenödems durch die Volumenüberladung [103].

Des Weiteren versuchte man in den in den sechziger und siebziger Jahren auch die Aktivkohle für die Entfernung der im Leberversagen akkumulierenden hydrophoben Toxine anzuwenden [104-107]. Trotz der hohen Adsorptionsfähigkeit überwogen die Nebenwirkungen wegen der nichtselektiven Adsorption der biologisch essenziellen Substanzen (Gerinnungsfaktoren, Hormone) die positiven Effekte [108, 109]. Beim Einsatz von Adsorberharzen im Falle eines direkten Kontaktes mit dem Blut oder Plasma des Patienten kommt es zu ähnlichen Komplikationen.

Um direkten Kontakt des Blutes mit Adsorbentien zu vermeiden, wurde in den achtziger und neunziger Jahren das BioLogic-System (-HD, -DT, DTPF) entwickelt. Die Dialyse erfolgte gegen eine Suspension aus Aktivkohle und Kationen-Austauscher in einem Zellulose-Plattendialysator [110-114]. Dieses System war das erste von der amerikanischen Gesundheitsbehörde zugelassene Leberersatzverfahren. Es gab auch einige Berichte über erfolgreiche Anwendung des BioLogic-Systems für die Behandlung der Patienten mit Leberversagen [110]. Es konnte

jedoch kein positiver Effekt der Behandlung mit dem BioLogic-System auf das Überleben bewiesen werden [112, 114, 115].

Das Funktionsprinzip der meisten modernen, artifiziellen LUS besteht darin, dass das Patientenblut bzw. Plasma in einem extrakorporalen Kreislauf durch einen Filter, dessen semipermeable Membran von einem Dialysat (meistens im Gegenstromprinzip) umspült wird, geleitet wird. Es entsteht ein Konzentrationsgradient, sodass die Toxine aus dem Patientenplasma in die Dialyseflüssigkeit diffundieren können. Bei manchen Systemen wird das Dialysat nach einmaliger Passage des Filters verworfen, bei anderen Systemen wird dieses im sekundären Kreislauf gereinigt und wieder verwendet. Das MARS®-System (Molecular Adsorbent Recirculation System) und das Prometheus-System® (fraktionierte Plasma-Separation und Adsorption) sind derzeit zwei wichtige und am meisten klinisch getestete artifizielle Leberunterstützungssysteme.

Prometheus ®

Im Prometheus-System wird ausschließlich körpereigenes Albumin benutzt, dadurch unterscheidet sich das Verfahren von den anderen Leberersatzverfahren, in welchen die exogene Albuminlösung für die Entfernung der albumingebundenen Toxine zugeführt wird. Das körpereigene Albumin wird durch einen albumindurchlässigen Filter vom Blut separiert und anschließend durch zwei Adsorber gereinigt. Nach Passage durch die Adsorber wird das Albumin dem Blut zurückgegeben. Wasserlösliche Toxine werden danach im Rahmen einer konventionellen Highflux-Hämodialyse herausgefiltert [116-119].

Eine unkontrollierte Phase-II-Studie an 11 Patienten mit akuter Verschlechterung des chronischen Leberversagens zeigte nach zwei Behandlungen signifikante laborchemische Besserungen [116]. Im Rahmen einer randomisierten, kontrollierten, multizentrischen Studie mit insgesamt 154 Patienten mit einer akuten Dekompensation der chronischen Lebererkrankung wurde der Einfluss der Behandlung mit dem Prometheus-System auf das 28-Tages- und das 90-Tages-Überleben untersucht. Es konnte keine positive Auswirkung auf das Überleben festgestellt werden [120].

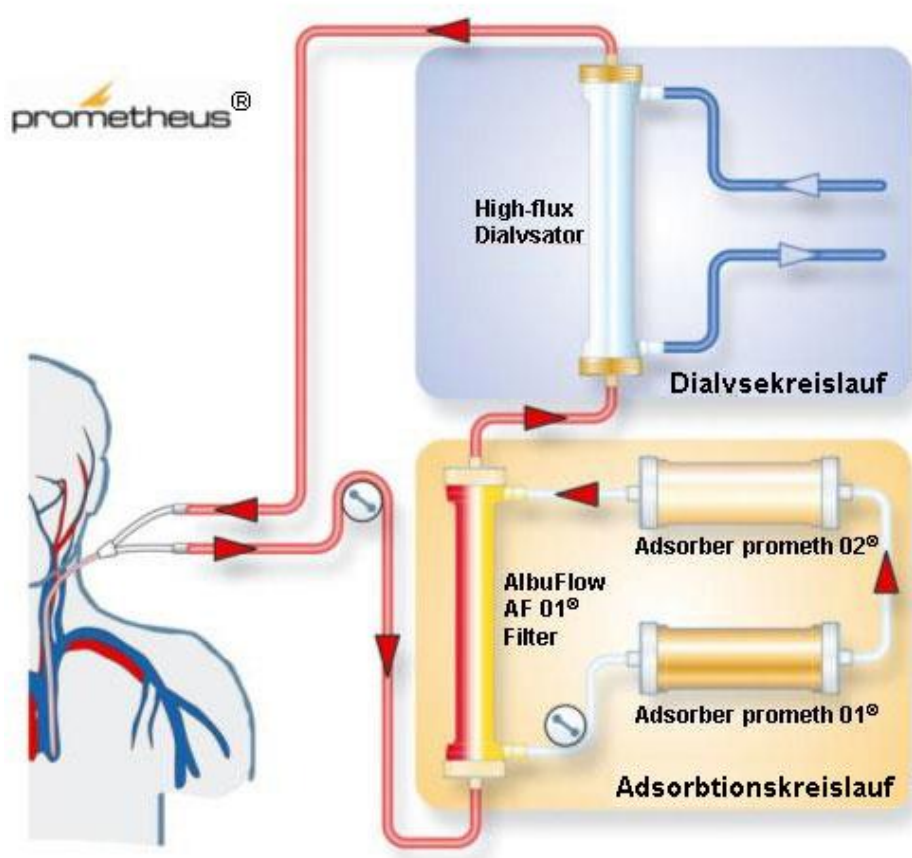


Abbildung 4 Prometheus-Systems®, Fresenius Medical Care (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Fresenius Medical Care).

MARS®

Das MARS-System (Molecular Adsorbents Recirculating System) wurde von Stange, Mitzner und Mitarbeitern entwickelt [121]. Das Patientenblut wird durch einen Highflux-Hämodialysefilter geleitet, eine Albuminlösung zirkuliert in einem sekundären Kreislauf. Diese Lösung wird durch einen Anionenaustauscher und einen Kohlefilter recycelt und wird danach zusätzlich durch eine konventionelle Hämodialyse dialysiert und somit zusätzlich von wasserlöslichen Toxinen gereinigt.

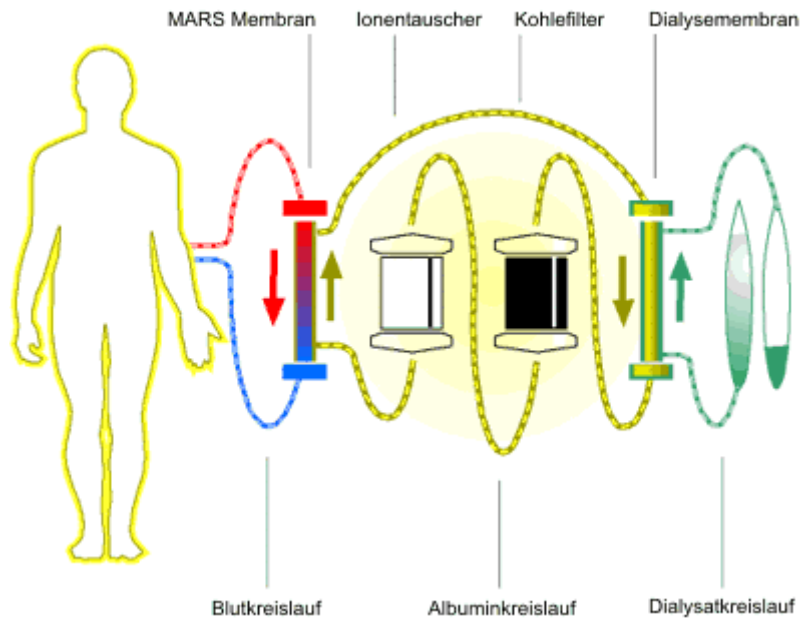


Abbildung 5 MARS®-Kreislauf (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Gambro Dialysatoren GmbH)

Aufgrund der im Vergleich zu anderen LUS relativ hohen Anzahl der behandelten Patienten weltweit wurden bereits einige randomisierte, kontrollierte Studien durchgeführt. Alle diese Studien zeigen einen positiven Einfluss auf den Schweregrad der hepatischen Enzephalopathie, der pathologisch erhöhten Laborparameter sowie der Hämodynamik der Patienten. Allerdings konnte keine Auswirkung auf das Langzeitüberleben, verglichen mit intensivmedizinischer Standardtherapie, gezeigt werden [43, 122, 123].

SPAD

Die Single-Pass-Albumin-Dialyse (SPAD) ist eine einfachste Form der Albumindialyse, welche mittels konventioneller Dialysemaschinen durchführbar ist [124-128]. Das Patientenblut durchströmt einen Highflux-Hämodialysefilter, die Außenseite der Filtermembran wird durch eine albuminhaltige Lösung im Gegenstromprinzip umspült. Die albuminhaltige Dialysatlösung wird nach einmaliger Passage des Filters verworfen. Es gibt keine kontrollierten Studien hinsichtlich der klinischen Anwendung der Single-Pass-Albumin-Dialyse.

Hepa Wash

Das Hepa Wash® ist ein von Kreymann et al. entwickeltes, artifizielles System, welches vom Prinzip dem MARS®-System sehr ähnelt. Im Patientenkreislauf werden genau wie beim MARS®-System proteingebundene Toxine aus dem Blut des Patienten mithilfe des albuminhaltigen Dialysats herausgefiltert. Um durch Albuminanwendung anfallende Kosten zu reduzieren, wurde ein neues Regenerationsverfahren für das exogene Albumin im sekundären Kreislauf erfunden. Dieses basiert auf pH- und Temperaturveränderungen. Das Konzept wurde kürzlich in einer präklinischen Studie an Tieren mit akutem Leberversagen getestet [129].

Tabelle 4 Übersicht der verschiedenen extrakorporalen LUS (modifiziert nach Rifai. K et al.) [5].

Zellbasierte LUS	
ELAD	HepG2-Zellen (C3A) + Ultrafiltration
AMC-BAL	Porcine Hepatozyten + Hämadsorption
BAL	Porcine Hepatozyten + Hämadsorption
BLSS	Porcine Hepatozyten + Hämadsorption
MELS	Humane Hepatozyten + SPAD + Highflux-Dialyse
ECLP	Patientenblut wird durch eine explantierte (humane oder xenogene) Leber in einer sterilen Kammer geleitet und dort recycelt
Artifizielle LUS	
Konventionelle Dialyseverfahren	Hämodialyse, Plasmapherese, Austauschtransfusion, Hämadsorption
Biologic-DT/-DTPF	Hämodialyse + Hämadsorption + Plasmaseparation
SPAD	Dialyse mit Albuminlösung
FPSA, Prometheus	Fraktionierte Plasmaseparation + direktes Albumin-Recycling im Sekundärkreislauf + Highflux-Dialyse
Hepa Wash	Dialyse mit Albuminlösung, Albumin-Recycling im Sekundärkreislauf mittels pH- und Temperaturveränderungen
MARS	Dialyse mit Albuminlösung, Albumin-Recycling im Sekundärkreislauf mittels Adsorber und Low-Flux-Dialyse

SPAD: Single Pass Albumin Dialysis; MARS: Molecular Adsorbent Recirculating System; FPSA: Fractionated Plasma Separation and Adsorption; BAL: Bioartificial Liver; ELAD:

Extracorporeal Liver Assist Device; BLSS: Bioartificial Liver Support System; MELs: Modular Extracorporeal Liver Support; ECLP: Extrakorporale Leberperfusion

1.6.4 Indikation für die extrakorporale Leberunterstützung

Zusammengefasst sind folgende Indikationen für die extrakorporale Leberunterstützung zu erwähnen [2, 74, 130-135]:

- Überbrückung der Leberfunktion bis zum Eintreffen eines Spenderorgans
- Verbesserung und Stabilisierung des präoperativen Zustands
- primäre Unterfunktion des Transplantates (primary graft poor function) oder Transplantatversagen (primary graft failure)
- Behandlung der extrahepatischen Komplikationen des ALV (Hepatische Enzephalopathie, Hirnödem, gestörte Hämodynamik, Nierenversagen, Koagulopathie, Infektionsanfälligkeit)

Darüber hinaus besteht der Bedarf für eine Leberunterstützung bei:

- akutem Organversagen bei chronischer Leberinsuffizienz
- Leberversagen im Rahmen eines Multiorganversagens
- Leberteileresektion mit Mangelfunktion der Restleber
- akutem Organversagen bei angeborenen Stoffwechselstörungen im Kindesalter.
- Detoxifikation bei Stoffwechselerkrankungen (M. Wilson)
- refraktärem Pruritus bei Cholestase

2.0 Fragestellung der Promotionsarbeit

Unsere In-vitro-Studie betrifft ein herkömmliches artifizielles Leberunterstützungssystem, die Single Pass Albumin Dialysis (SPAD). Dieses unterscheidet sich vom heutzutage häufig angewandten MARS durch eine niedrigere Albuminkonzentration ($< 4,4 \%$) und niedrigere Therapiekosten auf einer Seite und das Verwerfen der albuminhaltigen Lösung nach einmaliger Passage über Hämofilter auf der anderen Seite. Laut den vergleichenden In-vitro-Studien ist die Entgiftungskapazität der beiden Systeme fast gleich, wobei der Systemaufbau von SPAD einfacher ist. Außerdem erfordert die Ausführung des SPAD-Verfahrens durch die Fachkräfte auf der Intensivstation keine spezielle Schulung und ist dadurch vorteilhaft im klinischen Alltag. Das Konzept dieser Promotionsarbeit basiert auf der Vermutung, dass das Albumin als Trägermolekül für die beim Leberversagen relevanten Toxine beim Verwenden des SPAD-Dialyseverfahrens nach der einmaligen Passage des Filters verworfen wird, ohne komplett genutzt zu werden. Das Ziel dieser Arbeit ist, durch eine Modifikation der SPAD mittels Einbau einer zusätzlichen Pumpe für die Rezirkulation der Albuminlösung die Effizienz zu steigern und Therapiekosten zu sparen.

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten könnten ferner der Optimierung und Weiterentwicklung der extrakorporalen Leberunterstützungssysteme beitragen. Dazu ergaben sich folgende Fragestellungen:

Kann der Einsatz einer Pumpe für die Albuminrezirkulation zu einer messbaren Änderung der Entgiftungspotenz führen?

Bei welcher Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe kann die Effektivitätssteigerung erzielt werden?

Zur Erörterung oben genannter Fragestellungen wurden im Rahmen der insgesamt sechzehn Versuche mit verschiedenen Geschwindigkeiten der Rezirkulationspumpe die Plasmaspiegel von Bilirubin, Ammoniak, Harnstoff, Harnsäure, Albumin und Protein bestimmt.

3.0 Material und Methoden

Alle Versuche sind mit dem multifunktionellen, digitalelektronisch gesteuerten Dialysegerät „Multifiltrate“ (Fresenius Medical Care AG) und dafür vorgesehenen Materialien durchgeführt worden. Das Dialysegerät „Multifiltrate“ besteht aus einem Monitor mit LCD-Farbdisplay, vier Schlauchrollenpumpen, vier getrennten Waagen für die gravimetrische Bilanzierung, zwei integrierte Heizungen für die Einstellung der gewünschten Behandlungstemperatur.

Für alle im Rahmen dieser In-vitro-Studie durchgeführten Experimente wurde eine kontinuierliche veno-venöse Hämodiafiltration als Hauptverfahren ausgewählt (CVVHDF). Die CVVHDF kombiniert Hämofiltration und Dialysatfluss. Dadurch werden sowohl mittelgroße Moleküle besser eliminiert als auch die starke Hämokonzentration vermieden. Die Dialysatlösung wurde im Hämofilter im Gegenstromprinzip an der Außenseite der Kapillaren vorbeigeleitet. Die Substitution wurde als Postdilution durchgeführt, d. h., die Substitutionslösung wurde nach dem Hämofilter dem Plasma zugegeben. Für den Betrieb wurden der Fresenius HdF 100S Polysulfone Highflux Hämodiafilter (Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Deutschland) und die dafür hergestellten Schlauchsysteme verwendet.

Für die Dialysatrezirkulation wurde die Rollenpumpe (B. Braun Trio, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) benutzt. Mittels dieser Rollenpumpe wurde Dialyseflüssigkeit mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten gefördert. Die Versuchszahl betrug für jeden Aufbau-Modus $n = 4$. Alle Experimente wurden mit dem Fresenius HdF 100S Polysulfone Highflux Hämodiafilter (Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Deutschland) und die für das Dialysegerät hergestellten Schlauchsysteme durchgeführt.

3.1 Aufbau der „Single-Pass-Albumin-Dialyse“

Die Zirkulation des Plasmas erfolgt durch einen Highflux-Hämodiafilter (Fresenius Polysulfon Highflux Haemodiafilter, HdF 100S, Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland). An der Außenseite der Hohlfaserkapillaren wird im Gegenstromprinzip eine 3%ige Albuminlösung vorbeigeleitet. Die Albuminlösung wird nach Passage des Filters verworfen. Das Substitut im Sinne einer Standarddialyselösung wird nach dem Filter über den venösen Schenkel zugeführt (Postdilution-Modus)

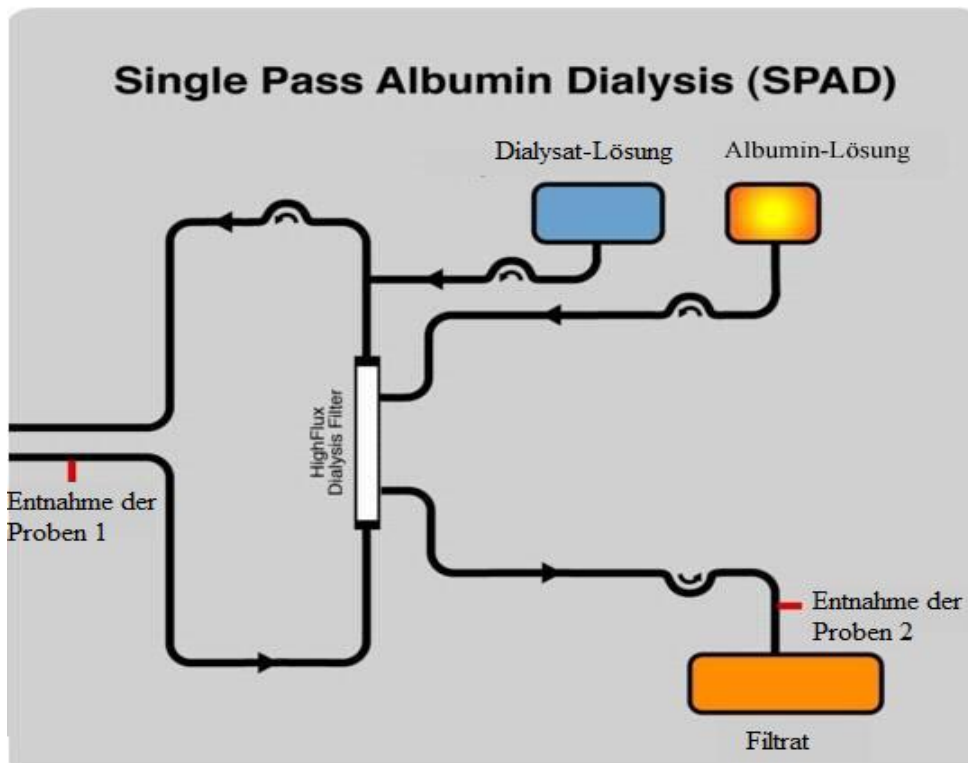


Abbildung 6 Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs im SPAD-Modus

3.2 Aufbau der „Open-Loop-Albumin-Dialyse“

Die Plasmazirkulation erfolgt durch einen Highflux-Hämodiafilter (Fresenius Polysulfon Highflux Haemodiafilter, HdF 100S, Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland). An der Außenseite der Hohlfaserkapillaren wird im Gegenstromprinzip eine 3%ige Albuminlösung vorbeigeleitet. Im Gegensatz zum SPAD-Konzept wird die albuminhaltige Dialysatlösung nicht nach Passage des Filters komplett verworfen, sondern ein gewisser Teil davon wird mittels einer zusätzlichen Pumpe aus der Filtrateleitung in die Dialysatleitung zurückgeführt. Als Rezirkulationspumpe dient die Braun-Trio-Pumpe, die mit einer dafür vorgesehenen Leitung mit Filtrat- und Dialysatleitungen verbunden ist. Zur Substitution wird eine Standard-bikarbonatlösung über den venösen Schenkel zugegeben (Postdilution).

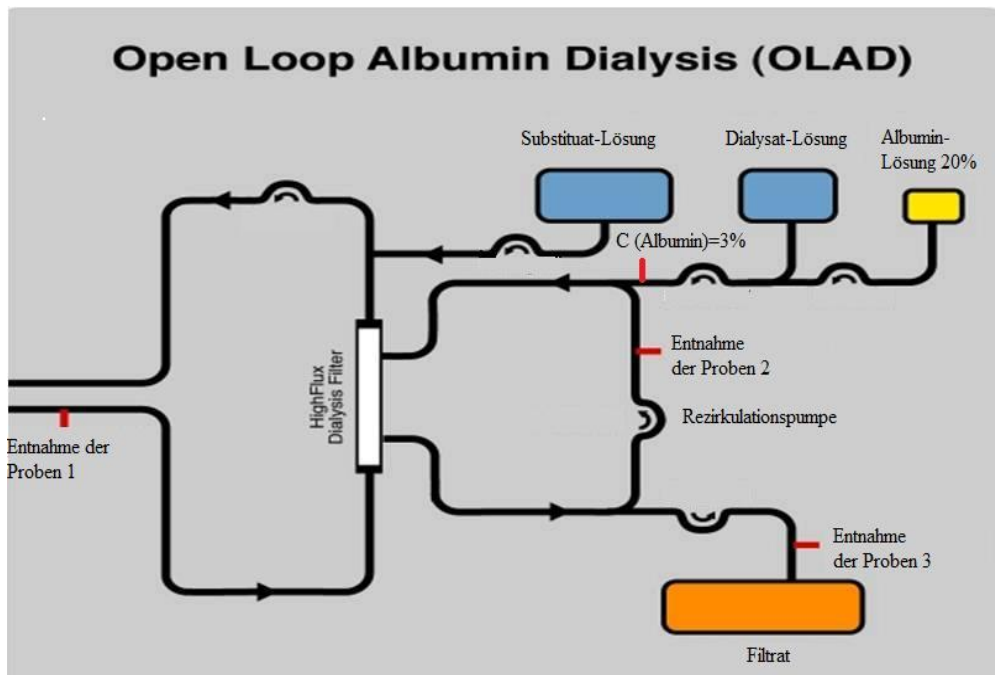


Abbildung 7 Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs im OLAD-Modus



Abbildung 8 Versuchsaufbau OLAD

(1) Multifiltrate (Fresenius Medical Care); (2) Pumpe für die Rezirkulation aus der Filtratleitung zurück in die Dialysatleitung; (3) 20 % Albuminlösung wird mit 105 ml/h in die Dialysatleitung mittels Infusomat (4) geleitet; (5) Plasmareservoir (eine Duran-Gewindeflasche von 5000 ml Volumen); (6) Filtratbeutel; (7) Dialysat-Lösung (8) Substitutat-Lösung

3.3 Plasmakreislauf

Als Ersatz für das Patientenblut wurde aus rheologischen Gründen humanes Plasma ausgewählt. Das angewendete Plasma stammt von Patienten, bei denen nicht aufgrund Lebererkrankungen Plasmapherese durchgeführt wurde. Die Verwendung des andernfalls verworfenen Plasmas erfolgte unter Zustimmung der lokalen Ethikkommission und nach individueller Einwilligung der Patienten. Das Plasma wurde heparinisiert (5 IU/ml) und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei $+20^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 24 Stunden für die Versuche wurde das Plasma vor Verwendung mittels des Hämotransfusionssystems mit dem Filter von Fibrinklumpen befreit. Alle Versuche sind unter gleichen Bedingungen mit 1700 ml Plasma durchgeführt worden. Das Plasma hat in jedem Versuch für 6 h zirkuliert.

3.4 Zugesetzte Toxine

Zur Simulation vom Blutkreislauf eines Patienten mit akutem Leberversagen wurde eine 5000-ml-Duran-Gewindeflasche (Höhe 34,5 cm, Durchmesser 18 cm) mit 1700 ml humanem Plasma gefüllt. Zur Simulation des Blutes wurde aus rheologischen Gründen das Plasma ausgewählt. Dem Plasma wurden beim Leberversagen relevante Toxine gemischt.

Folgende Substanzen wurden zum Plasma hinzugefügt, um eine hohe pathologische Konzentration zu erreichen:

41,46 mg Chenodeoxycholsäure (Sigma-Aldrich Chemie): ($50\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 2,1\ \text{mg/dl}$)

25,863 mg Cholsäure (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland): ($30\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 1,3\ \text{mg/dl}$)

25,47 mg Dehydrocholsäure (Sigma-Aldrich Chemie): ($30\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 1,3\ \text{mg/dl}$)

7,852 mg Deoxycholsäure (Sigma-Aldrich Chemie): ($10\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 0,4\ \text{mg/dl}$)

3,766 mg Lithocholsäure (Sigma-Aldrich Chemie): ($5\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 0,2\ \text{mg/dl}$)

305,808 mg unkonjugiertes Bilirubin (Sigma-Aldrich Chemie): ($300\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 17,5\ \text{mg/dl}$)

40,846 mg Tryptophan: ($100\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 2,0\ \text{mg/dl}$)

16,047 mg Ammoniumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland): ($150\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 0,8\ \text{mg/dl}$)

79,184 mg Kreatinin (Merck KGaA): ($350\ \mu\text{mol/l} \Rightarrow \sim 4,0\ \text{mg/dl}$)

2402,4 mg Harnstoff (Sigma-Aldrich Chemie): ($20\ \text{mmol/l} \Rightarrow \sim 120\ \text{mg/dl}$)

268,976 mg Harnsäure (Sigma-Aldrich Chemie): (800 $\mu\text{mol/l}$ \Rightarrow ~ 13,4 mg/dl)

Die Substanzen wurden in einer Lösung von 100 ml 0,1 M NaOH gelöst. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 20 % Essigsäure auf 7.4 eingestellt. 100 ml dieser Mischung wurden mit 1700 ml Plasma und 200 ml 20 % Humanalbumin gemischt.

3.5 Dialyselösung

Um die für den Versuch erforderliche 3%ige Albuminlösung zu erhalten, erfolgte die Zufuhr der Albuminlösung über die Infusionspumpe (Infusomat® fmS/B. Braun Melsungen), die mit der Dialysatleitung konnektiert wird. Die Albuminlösung wird mit der Geschwindigkeit 105 ml/h in die Dialysatleitung gefördert. Für den Dialysekreislauf wurde dieselbe Standarddialyselösung wie bei den anderen Systemen (Basislösung SH-BIC 35 in Kombination mit Pufferlösung SH-EL 02, beide B. Braun Shiwa GmbH & Co KG, Glandorf, Deutschland) verwendet. Die Dialysatlösung umfließt mit 700 ml/h die Außenseite der Hohlfaserkapillaren. Die Substitution erfolgt mit 1000 ml/h i.S. einer Postdilution. Alle Versuche wurden ohne Flüssigkeitsentzug betrieben.

3.6 Entnahme der Plasmaproben

Die Plasmaproben wurden vor dem Anfang der Behandlung sowie alle 10 Minuten während der ersten halben Stunde abgenommen. Dann erfolgte die Entnahme jede Halbestunde. Nach dem Versuch wurden die Proben im Zentrallabor der Charité, Campus Virchow-Klinikum, zweimal analysiert und es wurden Bilirubin-, Gallensäure-, Ammoniak-, Kreatinin- und Harnstoffspiegel bestimmt.

Alle Plasmaproben wurden im Zentrallabor der Charité, Campus Virchow-Klinikum mit der Hilfe der Standardanalysetechniken untersucht:

Harnstoff wurde mittels kinetischer UV-Methode nach Talke und Schubert (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland) ermittelt, Kreatinin wurde mit einer kinetischen kalorimetrischen Methode nach Jaffé (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland) bestimmt, Ammoniak wurde durch die enzymgebundene Glutamatdehydrogenase-Methode

nachgewiesen (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland), Gallensäuren sind durch einen enzymatischen Färbetest ermittelt worden (Merckotest Gallensäuren, E. Merck, Darmstadt, Deutschland) und Bilirubin wurde mit einer kalorimetrischen Messung (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland) gemessen.

Die Flaschen wurden mit einer Ein- und Auslassleitung bestückt. Im Inneren der Flasche bestand bodennah zwischen Ein- und Ausleitung ein Abstand von 20 cm. Damit wurde eine Kurzschlusszirkulation (Shunt) vermieden. Die Ein- bzw. Ausgänge wurden nun mit dem arteriellen bzw. venösen Schlauchleitungssystem verbunden. Die Rollerpumpe des Dialysegeräts ermöglichte die Plasmazirkulation mit einer Geschwindigkeit von 180 ml/min über einen Highflux-Hämodiafilter. Die arterielle Leitung wurde zur Gewinnung von Plasmaproben mit einem Luer-Lock-Drei-Wege-Hahn versehen. Das in der Flasche befindliche Plasma wurde mittels Wasserbad auf eine Temperatur von $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Zur gleichmäßigen Verteilung der Substanzen wurde die Flasche während der Versuche gleichmäßig mechanisch im Wasserbad bewegt.

Um den Einfluss der zusätzlichen Pumpe auf die Albuminrezirkulation zu prüfen, wurden alle Versuche unter gleichen Umständen durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Rezirkulationsgeschwindigkeit gleich der Geschwindigkeit der Blutpumpe (180 ml/min) eingestellt bzw. halbiert (90 ml/min) oder um das 1,5-Fache gesteigert (270 ml/min). Als Kontrolle wurden die Experimente ohne Einsatz einer Rezirkulationspumpe durchgeführt, d.h. im SPAD-Modus.

Tabelle 5 Vier Versuchsreihen mit verschiedenen Geschwindigkeiten der Rezirkulationspumpe im Überblick:

Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe	0 ml/min	90 ml/min	180 ml/min	270 ml/min
Albumin-Konzentration	3 %	3 %	3 %	3 %
Plasmafluss	180 ml/min	180 ml/min	180 ml/min	180 ml/min
Dialysatfluss	700 ml/h	700 ml/h	700 ml/h	700 ml/h
Substrat	1000 ml/h	1000 ml/h	1000 ml/h	1000 ml/h
Flüssigkeitsbilanz	± 0 ml/h	± 0 ml/h	± 0 ml/h	± 0 ml/h
Dauer der Versuche	6 h	6 h	6 h	6 h
Versuchsanzahl	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4

4.0 Ergebnisse und Statistik

Die Ausgangskonzentrationen der Toxine im Plasma wurden vor der „Behandlung“ bestimmt und betragen $17,06 \pm 0,4$ mg/dl Bilirubin gesamt; $235,6 \pm 14,4$ $\mu\text{mol/l}$ Ammoniak; $176,1 \pm 10,7$ mg/dl Harnstoff; $5,5 \pm 0,5$ mg/dl Kreatinin; $16,7 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/l}$ Harnsäure; $176,06 \pm 10,7$ $\mu\text{mol/l}$ Harnstoff; Bilirubin konjugiert $0,47 \pm 0,09$ mg/dl (alle Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung). Als Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse

galten die oben genannten Ausgangskonzentrationen für alle Aufbaumodi. Die Toxine wurden aufgrund unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften und Eliminationswege in zwei Gruppen eingeteilt: albumingebundene und wasserlösliche Toxine. Als Markersubstanz für die albumingebundenen Toxine wurde Bilirubin (gesamt und konjugiert) ausgewählt. Die Auswertung unsere Studie basierte auf der Bewertung von Konzentrationsveränderungen der Markersubstanzen im Plasma.

Zur Analyse wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Unabhängig von der verwendeten Methode (Gruppe 0-270) kommt es bei allen Endpunkten im Rahmen der Dialyse zu einem Abfall der Konzentration. Die Interaktionen zwischen Zeit und einzelnen Gruppen waren nicht signifikant verschieden voneinander, daher eliminieren keine Verfahren signifikant besser oder schlechter als die anderen.

Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wird als statistisch signifikant interpretiert.

4.1 Albumingebundene Toxine

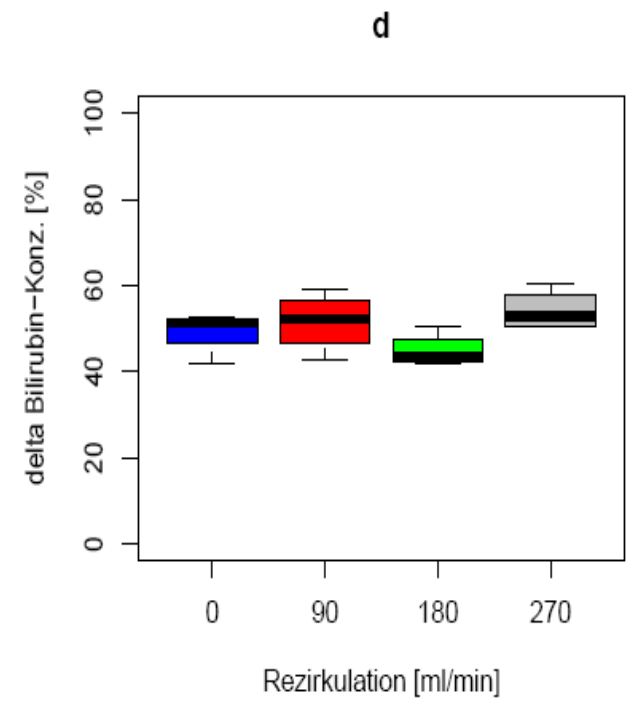
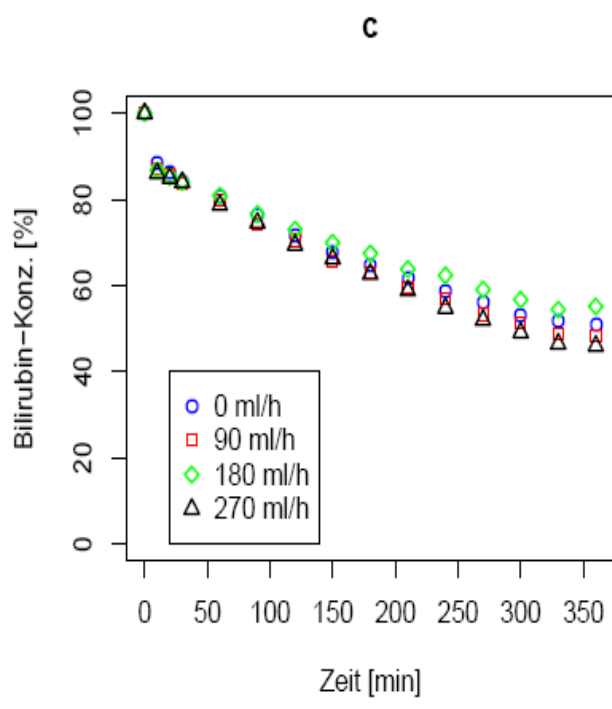
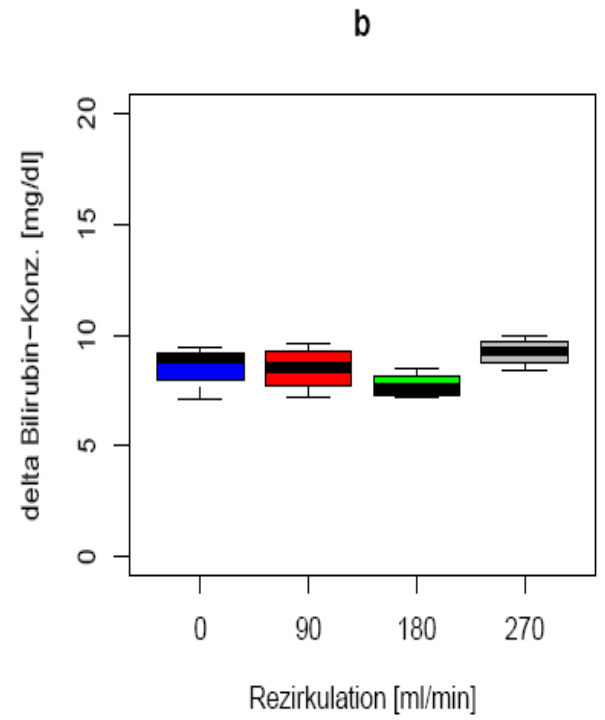
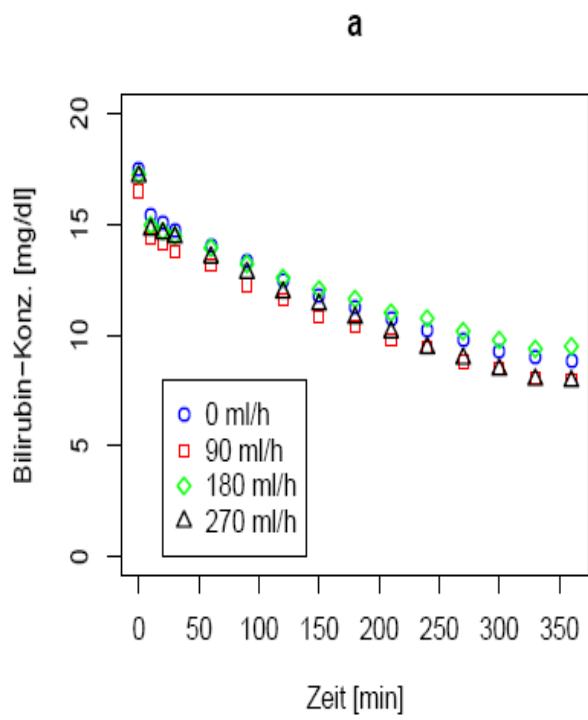
4.1.1 Gesamtbilirubin

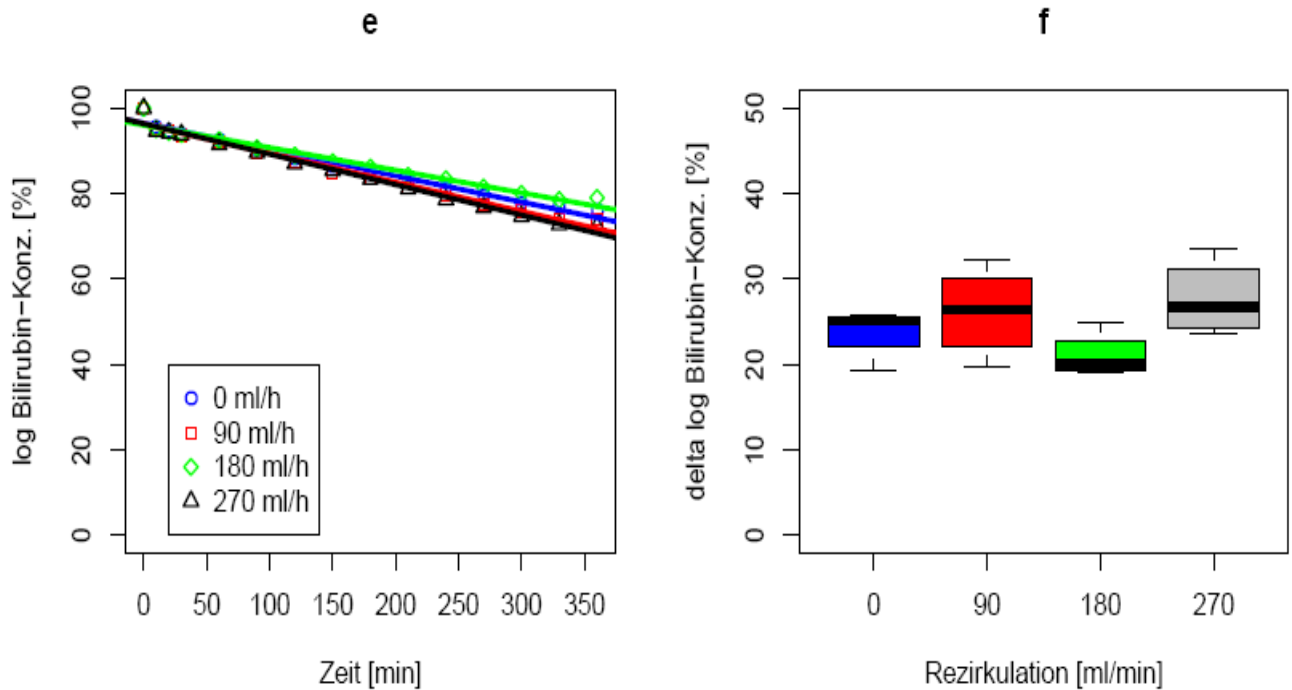
Das Gesamtbilirubin wurde durch OLAD-Modus mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min von $16,5 \pm 0,9$ mg/dl auf $8,0 \pm 1,3$ mg/dl reduziert. Es gelang, die Bilirubinkonzentration durch den Aufbau mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 180 ml/min von $17,2 \pm 0,4$ mg/dl auf $9,5 \pm 0,8$ mg/dl, zu senken. Beim Erhöhen der Rezirkulationsgeschwindigkeit auf 270 ml/min gelang es, den Bilirubinspiegel von $17,5 \pm 1,8$ mg/dl auf $7,5 \pm 1,5$ mg/dl zu senken. Beim Standardverfahren SPAD (ohne zusätzliche Pumpe für die Rezirkulation) konnte eine Reduktion der Bilirubinkonzentration von $17,4 \pm 0,4$ auf $8,8 \pm 0,6$ mg/dl erzielt werden.

Tabelle 6 Statistikergebnisse: Gesamtbilirubin (p-Wert bei Gruppe*Zeit >0,05).

	Schätzwert	Standardfehler	T-Wert	p-Wert
Parameter	86,96	2,31	37,59	1,15E-100
Zeit	-0,10	0,011	-8,58	1,32E-15
Gruppe 90	3,88	3,27	1,18	0,23
Gruppe 180	2,66	3,27	0,81	0,41
Gruppe 270	2,34	3,27	0,71	0,47
Zeit: Gruppe 90	0,02	0,016	1,20	0,22
Zeit: Gruppe 180	0,015	0,016	0,92	0,35
Zeit: Gruppe 270	0,002	0,016	0,16	0,86

Abbildungen 9a, c, e: Graphische Darstellung der Veränderung der Plasmakonzentration des Bilirubins (mg/dl) für die Versuchsreihen mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min (n = 4), 180 ml/min (n = 4), 270 ml/min und 0 ml/min (n = 4). **Abb. 9 b, d, f:** Differenz der Plasmakonzentrationen des Bilirubins nach 360 Minuten der Therapie (p > 0,05).





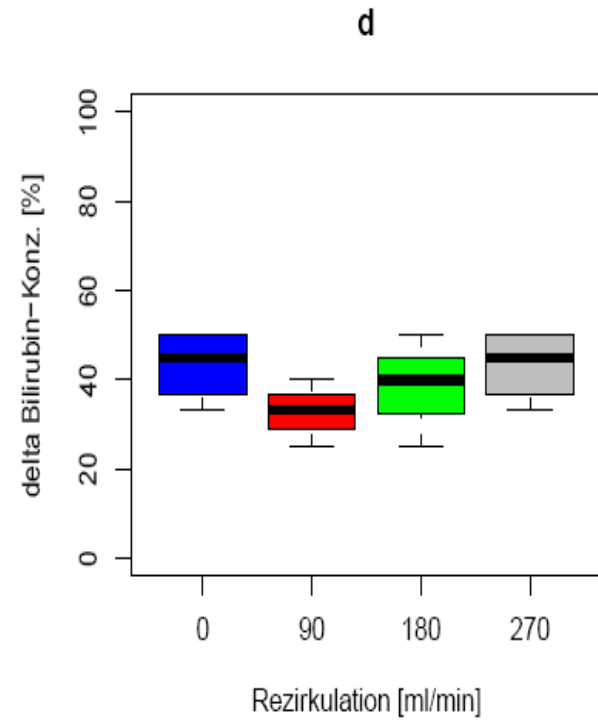
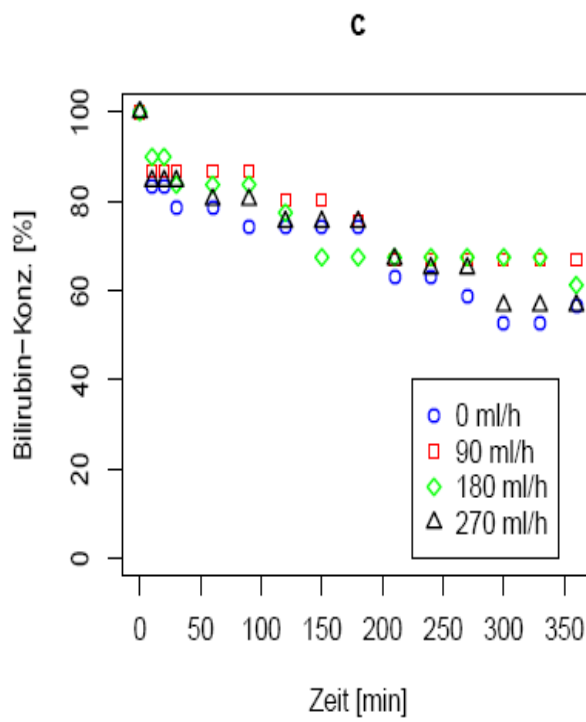
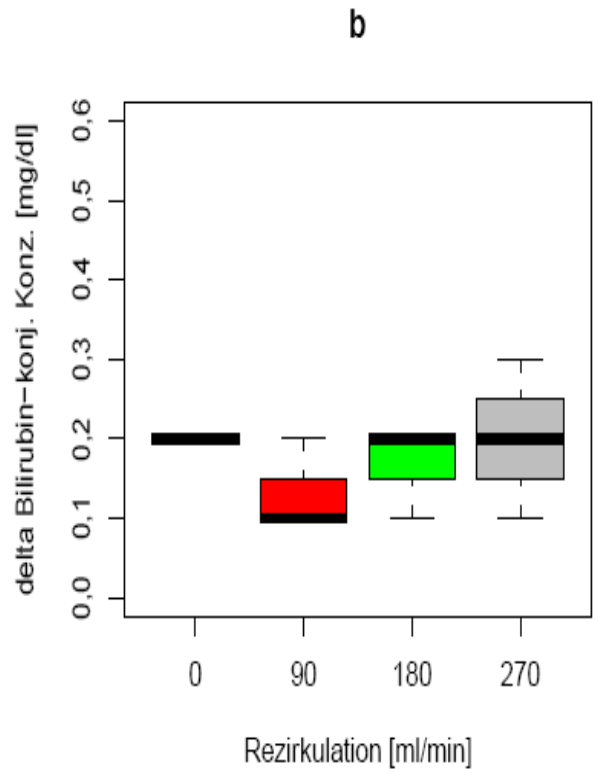
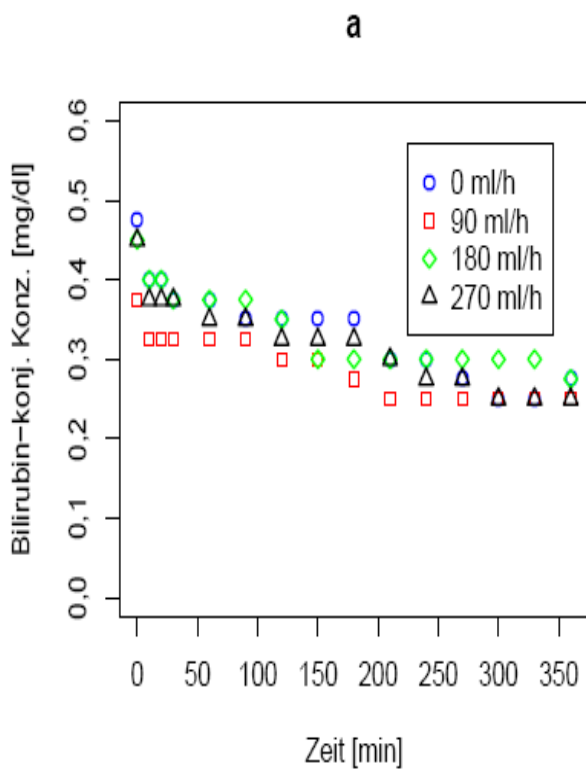
4.1.2 Konjugiertes Bilirubin

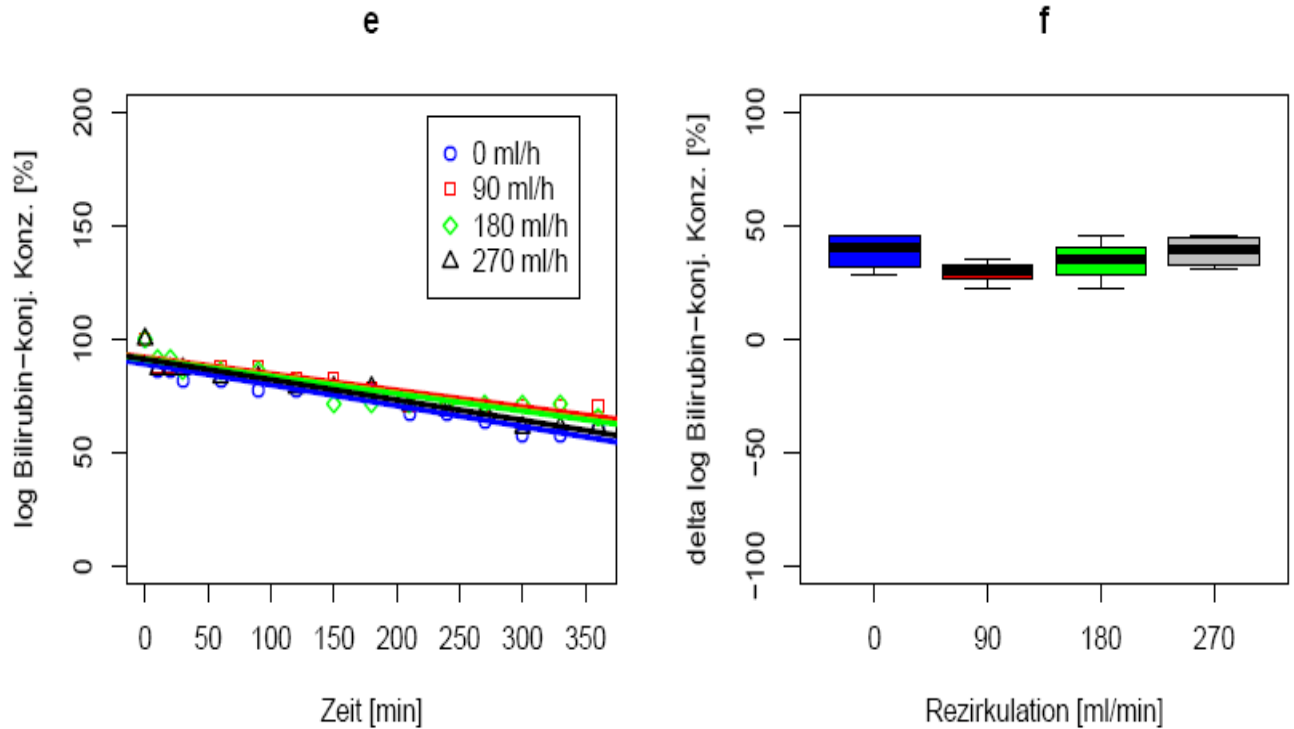
Eine Senkung des Plasmaspiegels des konjugierten Bilirubins wurde im Rahmen der OLAD-Behandlung mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min von $0,37 \pm 0,09$ mg/dl auf $0,25 \pm 0,05$ mg/dl erreicht. Eine Reduktion der Konzentration des konjugierten Bilirubins mittels OLAD mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 180 ml/min war von $0,42 \pm 0,05$ mg/dl auf $0,27 \pm 0,05$ mg/dl möglich. Bei der Steigerung der Rezirkulationsgeschwindigkeit auf 270 ml/min gelang es, den Bilirubinspiegel von $0,45 \pm 0,12$ mg/dl auf $0,25 \pm 0,05$ mg/dl zu senken. Beim Standardverfahren SPAD (ohne zusätzliche Pumpe für die Rezirkulation) wurde eine Reduktion der Bilirubinkonzentration von $0,47 \pm 0,09$ mg/dl auf $0,27 \pm 0,09$ betrachtet.

Tabelle 7 Statistikergebnisse: konjugiertes Bilirubin (p-Wert bei Gruppe*Zeit >0,05)

	Schätzwert	Standardfehler	T-Wert	p-Wert
Parameter	86,96	2,31	37,59	1,15E-100
Zeit	0,10	0,011	8,58	1,32E-15
Gruppe 90	3,88	3,27	1,18	0,23
Gruppe 180	2,66	3,27	0,81	0,41
Gruppe 270	2,34	3,27	0,71	0,47
Zeit: Gruppe 90	0,02	0,016	1,20	0,22
Zeit: Gruppe 180	0,015	0,016	0,92	0,35
Zeit: Gruppe 270	0,002	0,016	0,16	0,86

Abbildungen 10a, c, e: Graphische Darstellung der Veränderung der Plasmakonzentration des konjugierten Bilirubins (mg/dl) für die Versuchsreihen mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min (n = 4), 180 ml/min (n = 4), 270 ml/min und 0 ml/min (n = 4). **Abb. 10 b, d, f:** Differenz der Plasmakonzentrationen des konjugierten Bilirubins nach 360 Minuten der Behandlung (p > 0,05).





4.2 Wasserlösliche Toxine

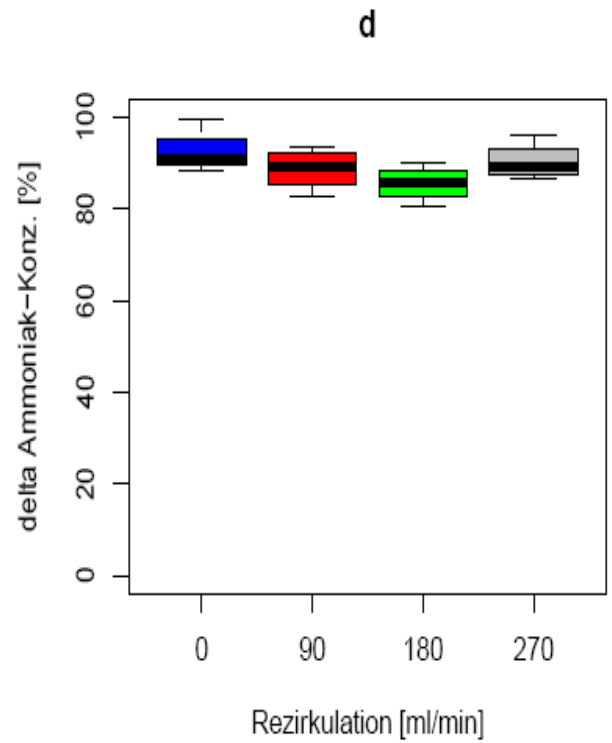
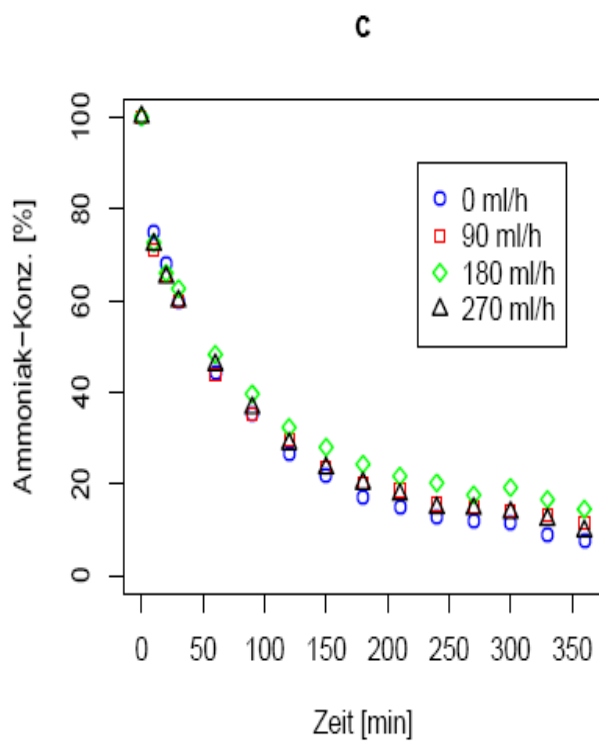
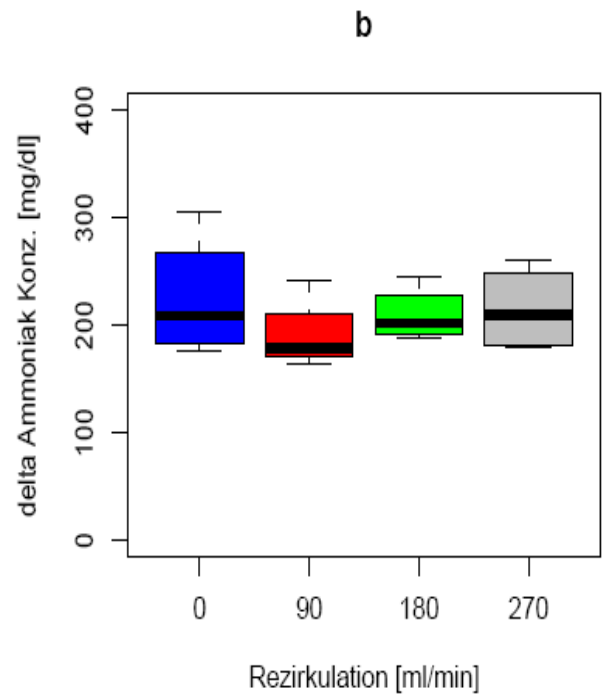
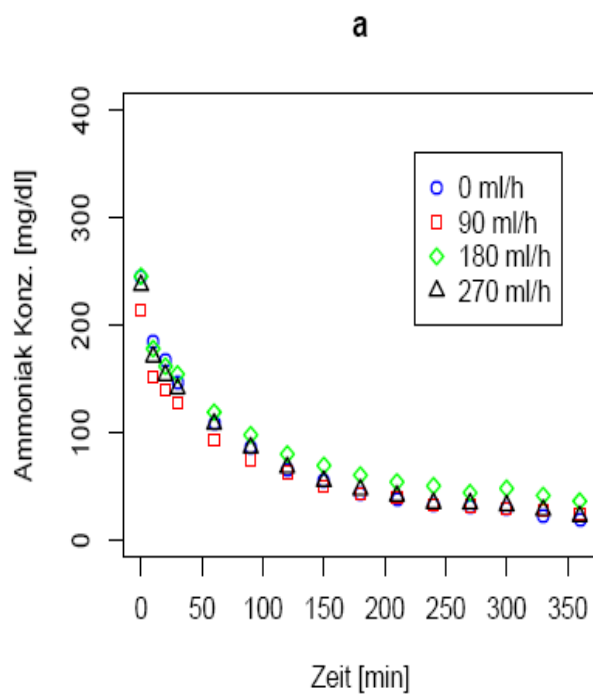
4.2.1 Ammoniak

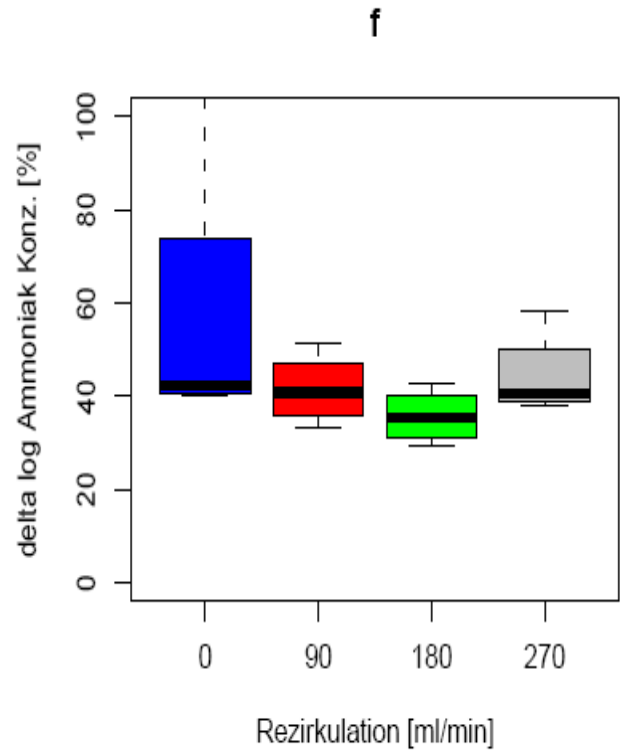
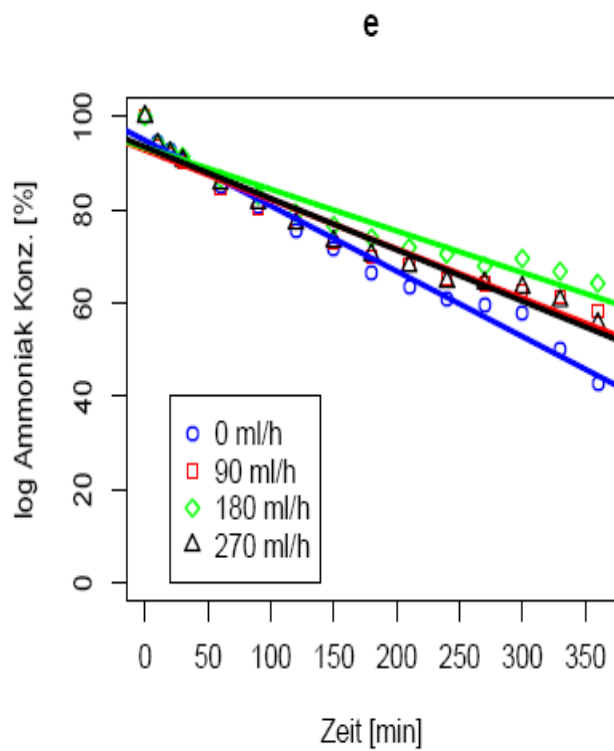
Die Ammoniakkonzentration wurde durch SPAD (Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe 0 ml/min) von $244,8 \pm 67,6$ mg/dl auf $19,6 \pm 12,9$ mg/dl reduziert. Bei der OLAD-Variante mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min sank der Ammoniakspiegel von $214,7 \pm 34,3$ mg/dl auf $24,2 \pm 8,7$ mg/dl. Mit 180 ml/min konnte eine Abnahme der Ammoniakkonzentration von $245,7 \pm 36,5$ mg/dl auf $36,3 \pm 13,7$ mg/dl erreicht werden und mit 270 ml/min ging die Konzentration von $237,2 \pm 38,5$ mg/dl auf $22,4 \pm 8,4$ mg/dl zurück.

Tabelle 8 Statistikergebnisse: Ammoniak (p-Wert bei Gruppe*Zeit >0,05)

	Schätzwert	Standardfehler	T-Wert	P-Wert
Parameter	66,89	2,83	23,60	1,28E-63
Zeit	0,20	0,014	14,39	5,35E-34
Gruppe 90	1,09	4,007	0,27	0,78
Gruppe 180	0,97	4,007	0,24	0,808
Gruppe 270	0,42	4,007	0,105	0,91
Zeit: Gruppe 90	0,016	0,020	0,808	0,41
Zeit: Gruppe 180	0,022	0,020	1,13	0,25
Zeit: Gruppe 270	0,011	0,020	0,55	0,57

Abbildungen 11a, c, e: Graphische Darstellung der Veränderung der Plasmakonzentration des Ammoniaks (mg/dl) für die Versuchsreihen mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min (n = 4), 180 ml/min (n = 4), 270 ml/min und 0 ml/min (n = 4). **Abb. 11 b, d, f:** Differenz der Plasmakonzentrationen des Ammoniaks nach 360 Minuten der Behandlung (p > 0,05).





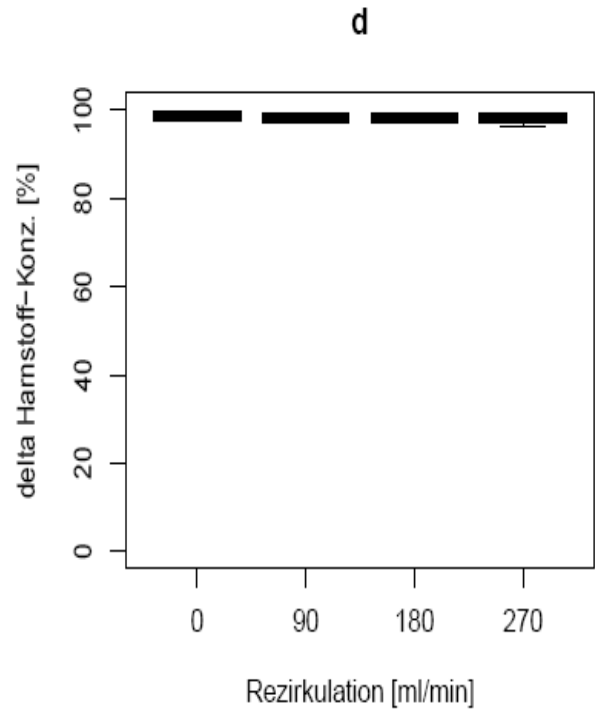
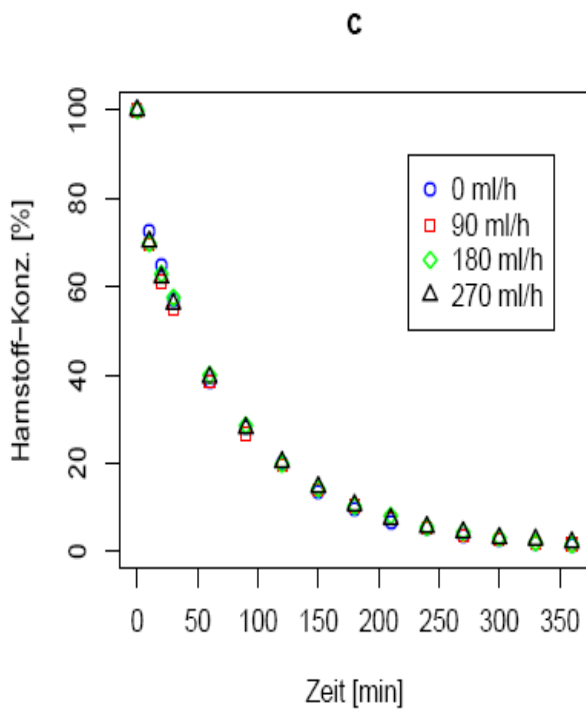
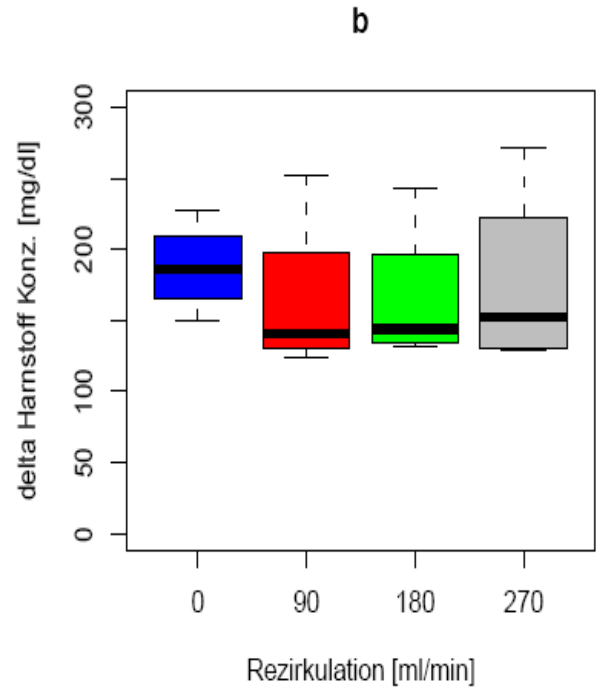
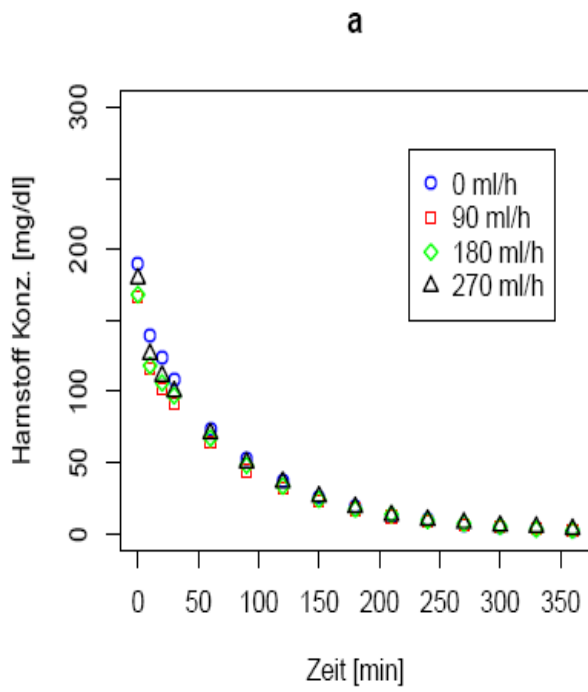
4.2.2 Harnstoff

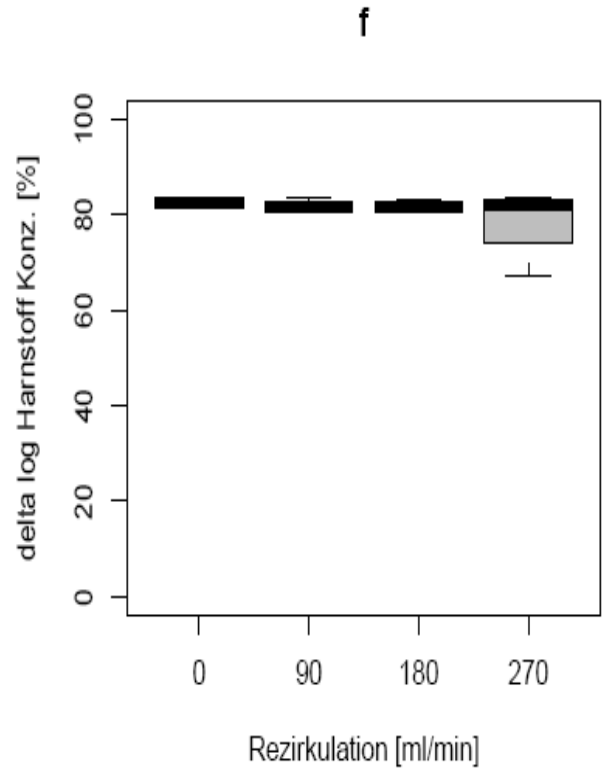
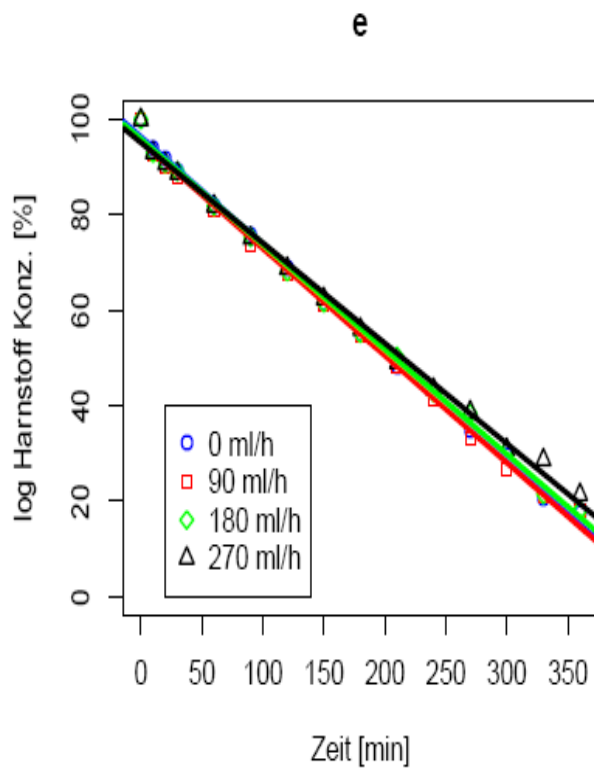
Die Harnstoffkonzentration wurde in allen Versuchsreihen bis auf $< 0,1$ mg/dl gesenkt. Die Ausgangskonzentrationen waren in der 90-ml/min-Versuchsreihe $166,7 \pm 59,4$ mg/dl, $168,2 \pm 52,4$ mg/dl bei 180 ml/min, $179,5 \pm 65,8$ mg/dl bei 270 ml/min, $189,7 \pm 32$ mg/dl bei SPAD.

Tabelle 9 Statistikergebnisse: Harnstoff (p-Wert bei Gruppe*Zeit >0,05)

	Schätzwert	Standardfehler	T-Wert	p-Wert
Parameter	65,45	3,25	20,12	1,07E-52
Zeit	0,23	0,016	14,05	7,46E-33
Gruppe 90	3,50	4,60	0,76	0,44
Gruppe 180	0,81	4,61	0,17	0,85
Gruppe 270	3,01	4,60	0,65	0,51
Zeit: Gruppe 90	0,013	0,02	0,58	0,55
Zeit: Gruppe 180	0,001	0,02	0,08	0,93
Zeit: Gruppe 270	0,011	0,023	0,51	0,60

Abbildungen 12 a, c, e: Graphische Darstellung der Veränderung der Plasmakonzentration des Harnstoffes (mg/dl) für die Versuchsreihen mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min (n = 4), 180 ml/min (n = 4), 270 ml/min und 0 ml/min (n = 4). **Abb. 12 b:** Differenz der Ausgangskonzentration des Harnstoffes vor Beginn der Behandlung (p > 0,05). **Abb. 12 f, d:** Zeigt, dass in allen Versuchsreihen der Harnstoff vollständig eliminiert werden konnte.





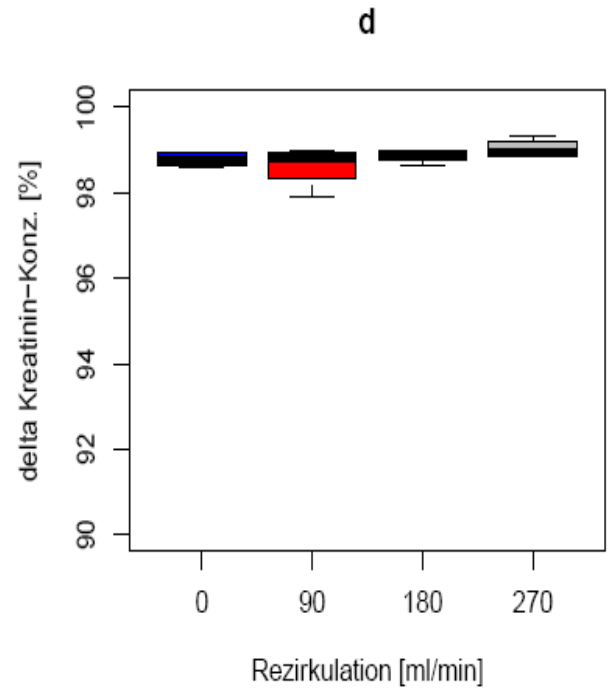
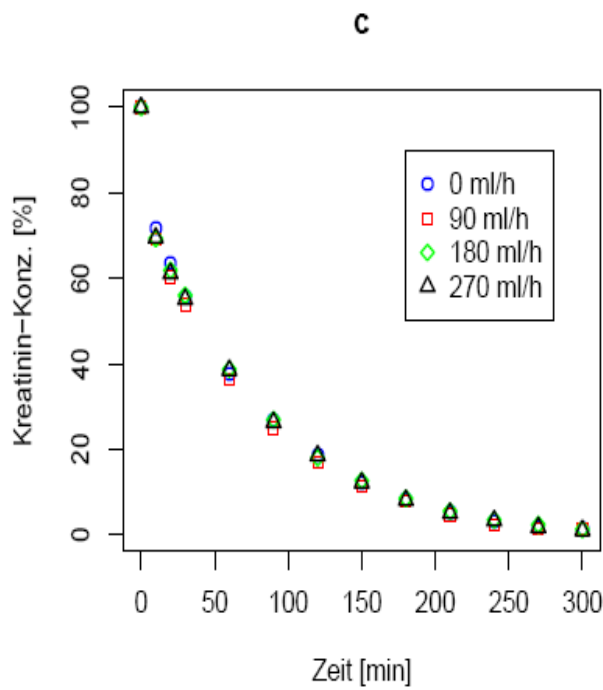
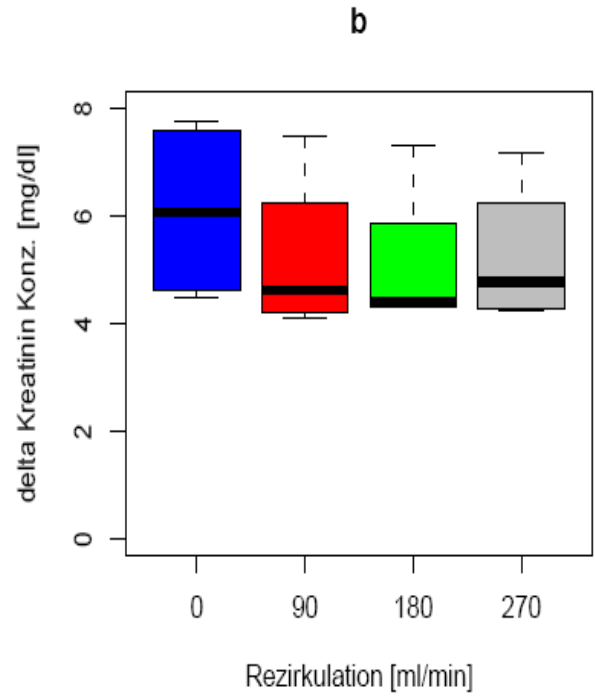
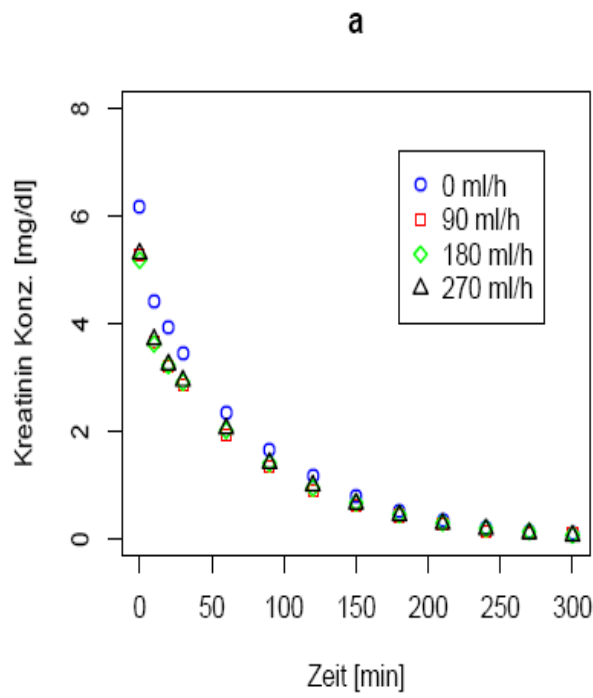
4.2.3 Kreatinin

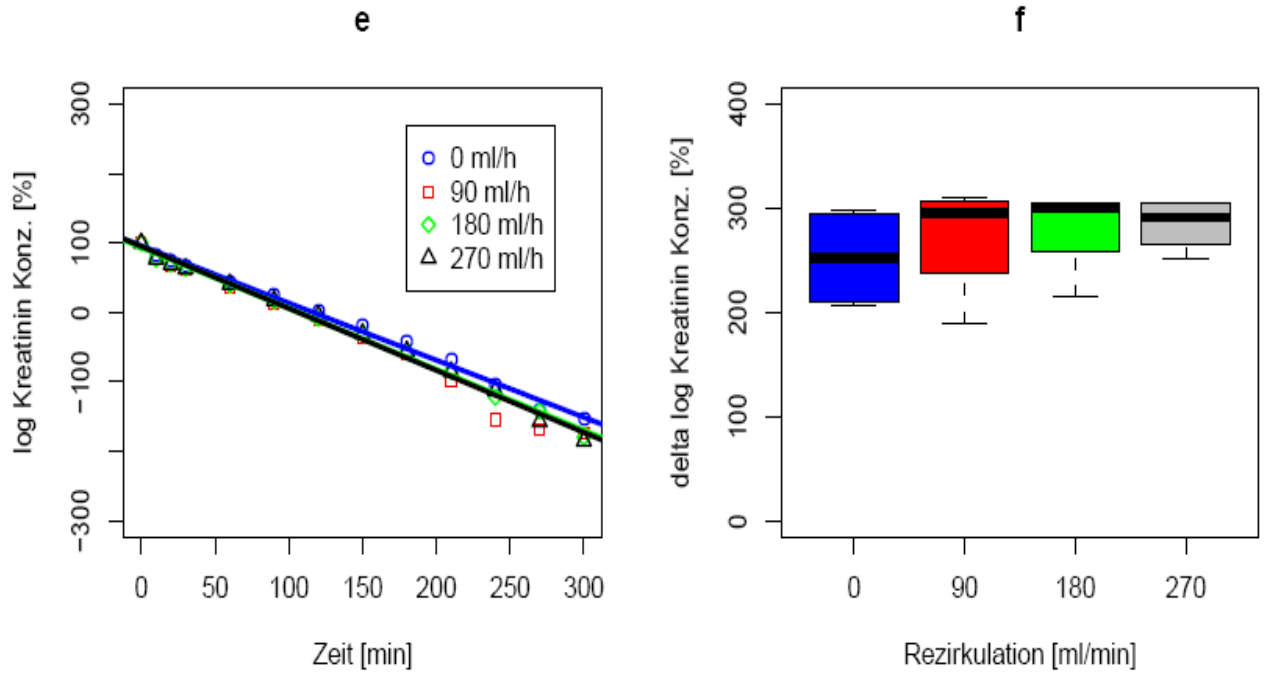
Es gelang eine Senkung des Kreatininspiegels bis auf $< 0,1$ mg/dl in allen Versuchsreihen. Die Ausgangskonzentrationen betragen bei 90 ml/min $5,28 \pm 1,6$ mg/dl; $5,17 \pm 1,3$ mg/dl bei 180 ml/min; $5,2 \pm 1,3$ mg/dl bei 270 ml/min; $6,17 \pm 1,7$ mg/dl im SPAD-Modus.

Tabelle 10 Statistikergebnisse: Kreatinin (p-Wert bei Gruppe*Zeit >0,05)

	Schätzwert	Standardfehler	T-Wert	p-Wert
Parameter	66,87	3,20	20,87	3,99E-52
Zeit	0,27	0,01	14,08	9,13E-32
Gruppe 90	2,0	4,52	0,44	0,65
Gruppe 180	0,60	4,52	0,13	0,89
Gruppe 270	0,87	4,52	0,19	0,84
Zeit: Gruppe 90	0,006	0,027	0,23	0,81
Zeit: Gruppe 180	0,003	0,027	0,14	0,88
Zeit: Gruppe 270	0,003	0,027	0,13	0,88

Abbildung 13 a, c, e: Graphische Darstellung der Veränderung der Plasmakonzentration des Kreatinins (mg/dl) für die Versuchsreihen mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min (n = 4), 180 ml/min (n = 4), 270 ml/min und 0 ml/min (n = 4). **Abb. 13 b:** Differenz der Ausgangskonzentration des Kreatinins vor Beginn der Behandlung (p > 0,05). **Abb. 13 f, d:** Zeigen, dass in allen Versuchsreihen Kreatinin vollständig eliminiert werden kann.





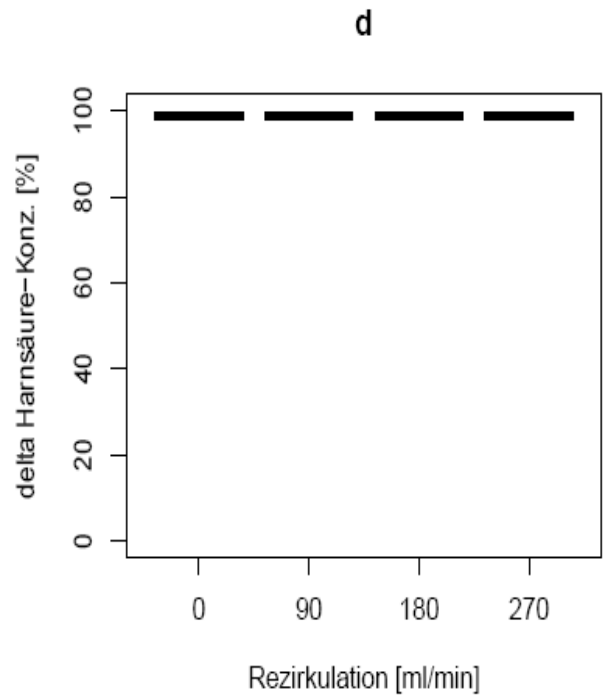
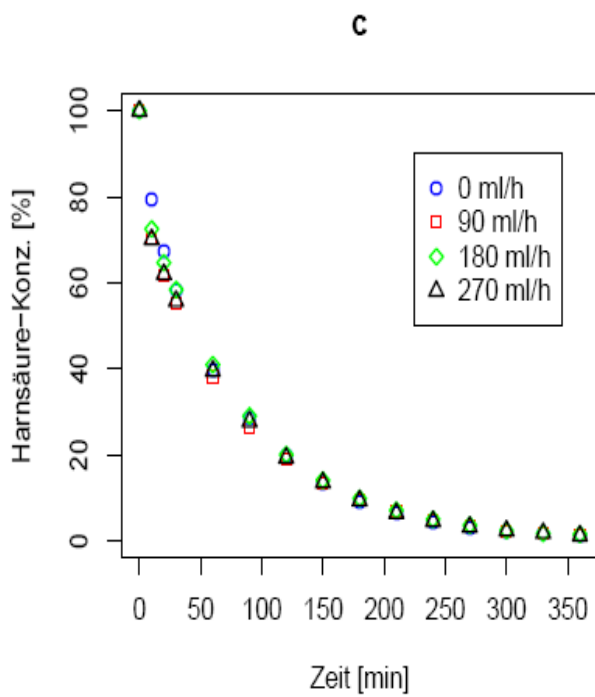
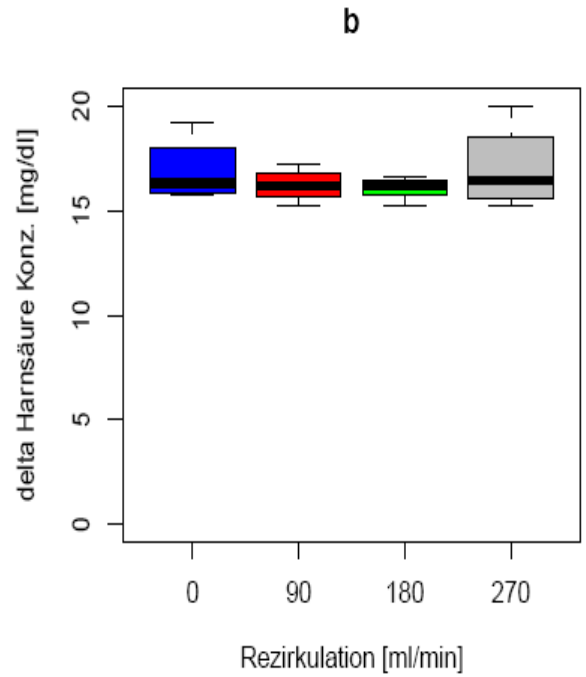
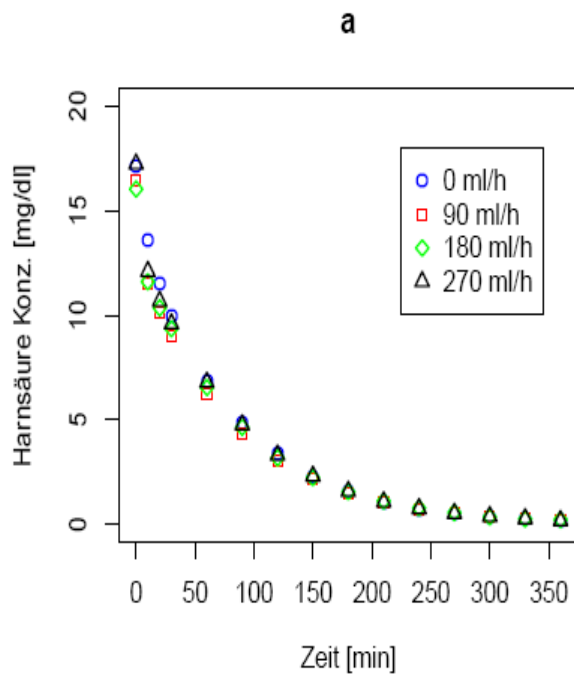
4.2.4 Harnsäure

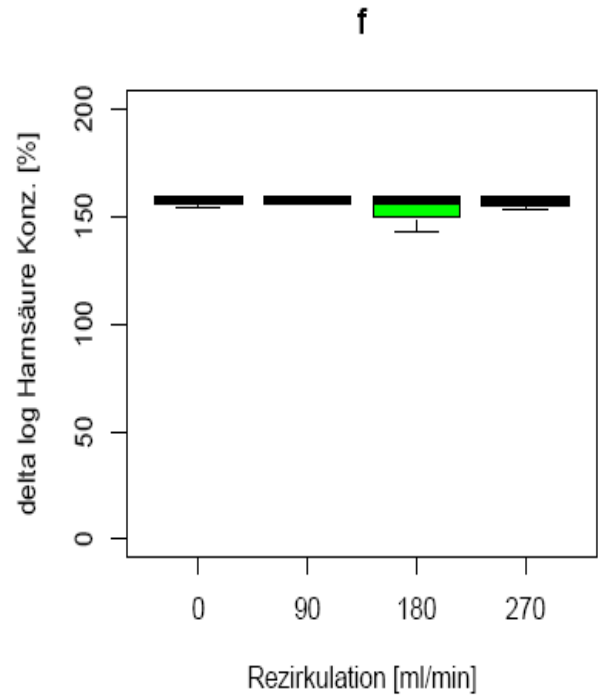
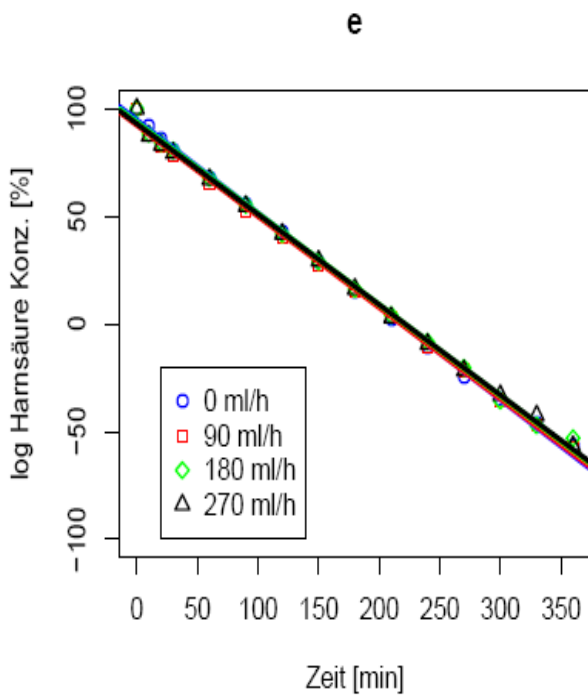
Im OLAD-Modus mit einer Rezirkulationsgeschwindigkeit von 90 ml/min konnte eine Reduktion der Harnsäurekonzentration von $16,4 \pm 0,8$ mg/dl auf $0,2$ mg/dl erzielt werden. Die OLAD mit 180 ml/min senkte den Harnsäurespiegel von $16,02 \pm 0,75$ mg/dl auf $0,17 \pm 0,12$ mg/dl. Mit einer OLAD von 270 ml/l konnte eine Abnahme der Harnsäure im Plasma von $17,2 \pm 2,11$ mg/dl auf $0,6 \pm 1,6$ mg/dl erzielt werden. Die Harnsäurekonzentration wurde durch SPAD von $17,07 \pm 1,6$ mg/dl auf $0,2$ mg/dl gesenkt.

Tabelle 11 Statistikergebnisse: Harnsäure (p-Wert bei Gruppe*Zeit >0,05)

	Schätzwert	Standardfehler	T-Wert	p-Wert
Parameter	63,46	3,18	19,95	2,98E-52
Zeit	-0,22	0,016	13,83	3,71E-32
Gruppe 90	1,61	4,49	0,35	0,71
Gruppe 180	-0,36	4,49	-0,080	0,93
Gruppe 270	-0,81	4,49	-0,180	0,85
Zeit: Gruppe 90	0,007	0,022	0,31	0,75
Zeit: Gruppe 180	0,003	0,022	0,16	0,86
Zeit: Gruppe 270	0,005	0,022	0,25	0,79

Abbildungen 14 a, c, e: Graphische Darstellung der Veränderung der Plasmakonzentration der Harnsäure (mg/dl) für die Versuchsreihen mit der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 90 ml/min (n = 4), 180 ml/min (n = 4), 270 ml/min und 0 ml/min (n = 4). **Abb. 14 b:** Differenz der Ausgangskonzentration der Harnsäure vor Beginn der Behandlung (p>0,05). **Abb. 14 f, d:** Zeigen, dass in allen Versuchsreihen Harnsäure vollständig eliminiert werden kann.





Zusammenfassung der Ergebnisse:

Insgesamt zeigt sich, dass der Faktor „Zeit“ signifikant ist (in allen Verfahren werden die entsprechenden Stoffe eliminiert) und der Faktor „Gruppe“ oder die Interaktion zwischen Gruppe und Zeit nicht relevant sind.

Die Interaktionen zwischen Zeit und den einzelnen Gruppen waren nicht signifikant verschieden voneinander und daher konnte kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Elimination der wasserlöslichen und albumingebundenen Toxine gefunden werden.

5.0 Diskussion

5.1 Anwendung der artifiziellen und bioartifiziellen Leber für die Behandlung des akuten Leberversagens

Akutes Leberversagen ist eine gravierende, klinische Entität mit oft letalem Verlauf. Dieses Krankheitsbild ist häufig rasch progredient und mit einer Beeinträchtigung der Funktion verschiedener Organsysteme, metabolischen Störungen, Gerinnungsstörungen und Sepsis vergesellschaftet. Die Letalität beim ALV ist von der jeweiligen Ätiologie abhängig und kann ca. 20-80% betragen [7, 136, 137].

Die Transplantation der Leber ist in der Chirurgie beim Leberversagen klinische Routine. Das große Problem ist die Verfügbarkeit von Spenderorganen. Dieses Problem kann vermieden werden, wenn eine extrakorporale Leberunterstützung als Therapieverfahren bei den Patienten mit dem Leberversagen genutzt wird. Beim akuten Leberversagen werden die endogenen Substanzen (endogene Benzodiazepine, Phenole, aromatische Aminosäuren, kurz- und mittelkettige Fettsäuren, Merkaptane, Gallensäuren, Ammoniak, NO), die in signifikant erhöhten Konzentrationen toxisch sind, akkumuliert.

Diese Toxine wie Bilirubin, Gallensäuren, aromatische Aminosäuren usw. werden mittels Albumin transportiert. Bei gesunden Menschen wird Albumin von der Leber gereinigt. Ein Leberversagen führt zur unzureichenden Entgiftung des Albuminmoleküls mit konsekutiver Überladung der Binderstellen des Albumins durch die Endo- und Exotoxine bei gleichzeitiger Verminderung der Albuminkonzentration im Plasma aufgrund fehlender Synthesefunktion der Leber. Daraufhin werden die Toxine im Gewebe angereichert, was zu sekundärem Organversagen (z. B. Im Rahmen eines Hepatorenalen Syndroms) führen kann. Im Falle eines Leberversagens können aber auch andere Entgiftungsformen zur Vermeidung der negativen klinischen Auswirkungen für die Leber benötigt werden. Eine Übernahme der Entgiftungsfunktion der Leber mittels maschineller Leberersatzverfahren kann eine selbständige Regenerierung der Leber unterstützen oder ermöglicht dem Patienten das Überleben, bis ein Transplantat verfügbar ist. Die Entgiftung kann gegenwärtig mittels verschiedener Techniken der Leberersatztherapie erfolgen (u. a. Kombination von Plasmaaustausch mit Hämodiafiltration, Prometheus®-System: fraktionierte Plasmaseparation und Adsorption, MARS®: Molecular

Adsorbent Recirculating System, SPAD: Single-Pass-Albumindialyse). Derzeit ist kein bioartifizielles Leberunterstützungssystem kommerziell erhältlich. Das vielversprechende Konzept der bioartifiziiellen Systeme kann derzeit den Anforderungen des klinischen Alltags nicht gerecht werden. Solche zellbasierten Systeme sollen anders als die artifiziellen Leberersatzverfahren nicht nur die Entgiftungsfunktion, sondern auch andere ausgefallene Funktionen (z. B. Synthesefunktion) der Leber ersetzen. Der Kern eines solchen Systems ist ein Bioreaktor mit porcinen oder humanen Hepatozyten (gegenwärtig werden auch humane immortalisierte Hepatozyten, Klon (C3A) der HepG2-Zelllinie benutzt), die in einer Matrix aus Hohlfasern integriert sind. In einem Bioreaktor werden die Giftstoffe langsam unzureichend durch Hepatozyten metabolisiert. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2004 („Pharmacokinetic considerations in development of a bioartificial liver“) werden die Ursachen für die offensichtlichen Probleme bei der Entwicklung und Anwendung der zellbasierten Leberunterstützungssysteme von H. Iwata thematisiert. Diese sind: deutlich geringerer Blutfluss durch den Bioreaktor (100-300 ml/min) als durch die Leber, deren Durchsatz unter physiologischen Bedingungen ca. 1500 ml/min beträgt, daraus resultierende niedrige Metabolisierung der Substanzen; geringere Zellmasse von funktionstüchtigen Hypatozyten von ca. 70-100 ml, wobei die Mindestmasse der Leber, die für eine vollständige Erhaltung der Leberfunktionen notwendig ist, bei ca. 300-500 g liegt. Die menschliche Leber wiegt ca. 1500 g und enthält über 80 % Hepatozyten, d. h. über 1200 g. Mithin sollte zur effektiven Ersetzung sämtlicher Leberfunktionen ein Bioreaktor mit mehreren Hunderten Gramm der menschlichen Hepatozyten und mit einer extrakorporalen Perfusionsrate von mehr als 1000 ml/min gebaut werden. Laut Iwata kann momentan nur eine Lebertransplantation diese Kriterien erfüllen [138]. Neben den genannten Schwierigkeiten fehlt bei den modernen Bioreaktoren die Exkretionsfunktion [139]. Sollten die Zellen in der Lage sein, Galle zu produzieren, entsteht das Problem des entsprechenden Galleabflusses. Die Entgiftungsfunktion der heutigen bioartifiziiellen Leberunterstützungssysteme erfolgt entweder durch Aktivkohlefilter oder zusätzliche Albumindialyse oder ungewollt durch Adsorption der Toxine an die intrazellulären Bindungsproteine. Einige der zu entfernenden Substanzen wirken zytotoxisch auf die Hepatozyten und können somit die Lebensdauer der Bioreaktor-Zellen ungünstig beeinflussen [140]. Bei Verwendung der Bioreaktoren mit xenogenen Zellen besteht außerdem eine potentielle Gefahr, Zoonosen zu übertragen. Bei der Einsetzung von Bioreaktoren mit Hepatoma-Zelllinien kann ein mögliches Krebsrisiko nicht sicher ausgeschlossen werden [139, 141].

Um die fehlenden metabolischen Funktionen der Leber zu komplettieren, wurde ein Modulares Extrakorporales Leberunterstützungs-System (MELS) entwickelt. Dabei wird ein Bioreaktor mit primären humanen Leberzellen (CellModule) mit SPAD in CVVHDF-Modus (Detox-Module) kombiniert. Im Bioreaktor (CellModule) befinden sich ca. 300-500 g primäre humane Leberzellen in Kokultur mit Nichtparenchymzellen. Diese Zellen werden aus Organen isoliert, welche für eine Lebertransplantation entnommen wurden, dann aber aufgrund der schlechten Organqualität abgelehnt wurden. Die Hohlfasern im Innenraum des Polyurethangehäuses sind so miteinander verwoben, dass ein regelmäßiges Muster aus Versorgungsstrukturen entsteht, wie man es in den Lobuli der Leber findet [61, 142]. Das MELS-Konzept wurde bereits klinisch in der chirurgischen Klinik der Berliner Charité erfolgreich erprobt, weist jedoch ähnliche Mängel wie andere bioartifizielle Systeme im klinischen Alltag auf.

Als prinzipiell anderes Konzept einer Leberdialyse stellt sich ein Prometheus®-System (Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Deutschland) dar. Dieses System basiert auf dem sog. FPSA-Verfahren (Fractionated Plasma Separation and Adsorption) und wurde von Falkenhagen et al. 1999 zuerst beschrieben. Das Plasma wird durch einen albumindurchlässigen Filter (Albuflow®-Cutoff von 250 kDa) vom Blut separiert und in einem Sekundärkreislauf über zwei Adsorber geleitet (einen Neutralharz-Adsorber aus Styrol-Divinylbenzol-Kopolymer und einen Ionenaustauscher, der Chlorid als Gegenion benutzt), dabei erfolgt eine Reinigung des Albumins von Liganden (Exo- und Endotoxinen). Anschließend wird das Plasma wieder dem Blut zugeführt. Das Vollblut wird durch einen Highflux-Filter geleitet und eine konventionelle Hämodialyse zur Elimination der wasserlöslichen Toxine durchgeführt. Seitdem das System zum ersten Mal beschrieben wurde, kam es zu einer Reihe von technologischen Veränderungen. Die erste Version von Falkenhagen et al. hatte einen Aktivkohle-Adsorber (kein Neutralharz-Adsorber), der sich zusammen mit dem Anionenaustauscher und dem Filter für die Hämodialyse innerhalb des FPSA-Kreislaufs befand [119].

Bei der Therapie mit dem Prometheus-System findet anders als bei MARS® ein direkter Kontakt zwischen dem albuminhaltigen Plasma und dem Adsorber statt, was eine Verbesserung der Entgiftungskapazität bewirken soll. Allerdings kann eine unselektive Filtration der Plasmaproteine zu einer Verminderung der Konzentration mehrerer Gerinnungsfaktoren führen.

Meijers et al. berichten über eine bedeutsame Senkung mehrerer Gerinnungsfaktoren von mehr als 50 %: Faktor II, Faktor X und Protein C. Es wird betont, dass ein direkter Kontakt zwischen

fraktioniertem Plasma und dem Prometh02-Anionenaustauscher durch eine Adsorption der o. g. Faktoren klinisch relevante Gerinnungsstörungen verursachen kann.

Die beiden kommerziellen Systeme- MARS® und Prometheus® wurden bereits in mehreren Studien miteinander verglichen. Laleman et al. berichten über eine randomisierte Studie mit insgesamt achtzehn Patienten mit fortgeschrittener alkoholtoxischer Zirrhose. Es wurden sechs Patienten der Kontrollgruppe konventionell behandelt, sechs andere Patienten mit MARS®-System, weitere sechs mithilfe von Prometheus®. Die extrakorporale Behandlung erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen (je 6 Stunden pro Behandlung). Es wurden Kreislaufparameter (mittlerer arterieller Druck, der systemische vaskuläre Gefäßwiderstand, Herzindex, ZVD), Leberwerte sowie die Konzentration von vasoaktiven Substanzen (Renin, Aldosterone, Norepinephrine, Vasopressin, Nitrat/Nitrit) vor und nach jeder Behandlung bestimmt. Die Studie zeigte eine günstigere Auswirkung der Behandlung mit MARS® auf hyperdynamische Kreislaufsituation, während das Prometheus-System eine signifikant höhere Detoxifikationskapazität hervorbringen konnte [29].

Unsere In-vitro-Studie betrifft ein albuminbasiertes konventionelles Entgiftungsverfahren, die Single Pass Albumin Dialysis. Dieses unterscheidet sich vom MARS durch eine niedrigere Albuminkonzentration (< 4,4 %) und das Verwerfen der albuminhaltigen Lösung nach einmaliger Passage über Hämofilter. Die Ergebnisse der In-vitro-Studien deuten auf zumindest das gleiche detoxifizierende Potential des SPAD-Konzeptes sowie auf Vorteile hinsichtlich des Systemaufbaus und der Kosten im Vergleich mit dem MARS®-System hin.

Im intensivmedizinischen Bereich werden auch die herkömmlichen Nierenersatztherapien wie Hämodialyse oder Hämodiafiltration bei den Patienten mit Leberversagen in Kombination mit Nierenversagen z. B. im Rahmen eines hepatorenalen Syndroms angewandt. Mittels dieses Verfahrens können nur wasserlösliche Toxine eliminiert werden, für die Entfernung proteingebundener Toxine sind diese Methoden völlig ineffektiv.

5.2 Das Prinzip der Albumin-Dialyse

Das Konzept der Single Pass Albumin Dialysis sowie des Moleculer Adsorbents Recirculating System basiert auf der Verwendung albuminhaltigen Dialysats. Die eiweißgebundenen Toxine liegen auch zu einem Teil in einer ungebundenen Form vor. Nach der Zugabe von

Humanalbumin mit freien Bindungsstellen als Adsorbent zum Dialysat können die freien Toxine von der Blutseite durch die semipermeable Membran zur Dialysatseite diffundieren, um dort an das Albumin zu binden. Das Gleichgewicht zwischen gebundenen und ungebundenen Toxinen im Blut wird durch solche Behandlung kontinuierlich in Richtung des ungebundenen Toxins verschoben. Dadurch kann eine effektive Elimination erfolgen [143].

Abbildung 15 zeigt eine Darstellung des Prinzips der Albumindialyse. Das Albumin dient als Akzeptor für die wasserunlöslichen Toxine. Das toxinbeladene Albumin des Patienten wird durch Übertragung der Toxinmoleküle auf das Albumin der Dialyselösung von diesen Toxinen befreit. Dadurch steht das derart gereinigte Albumin nun wieder im körpereigenen Kreislauf zur Bindung von nicht wasserlöslichen Toxinen zur Verfügung (s. u.).

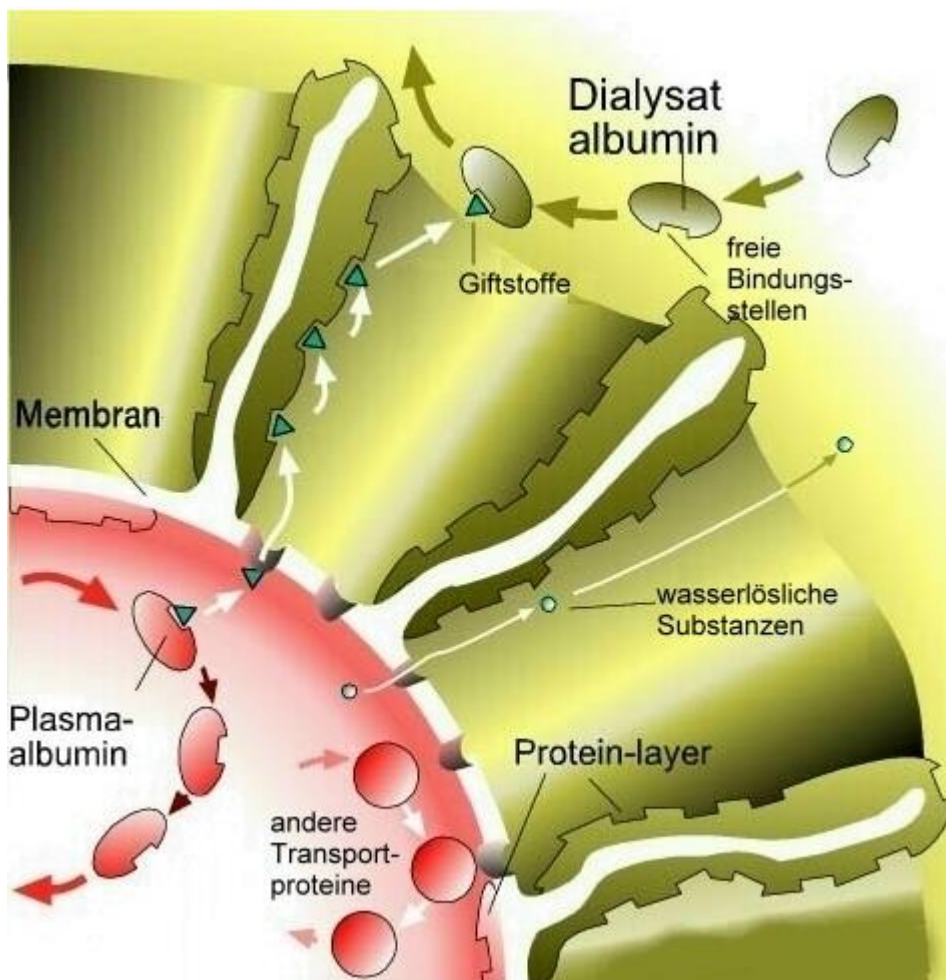


Abbildung 15 Prinzip der Albumindialyse (MARS®-Membran; Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Gambro Dialysatoren GmbH)

Es wird davon ausgegangen, dass den Transportvorgängen der Albumindialyse, genau wie bei einer herkömmlichen Dialyse, die Mechanismen der Diffusion zugrunde liegen [144].

Der Konzentrationsgradient zwischen Plasma und Dialysat treibt den Stofftransport über die Membran an (die Konzentration der Stoffe beidseits der semipermeablen Membran spielt keine Rolle). Dieser Prozess kann durch das Diffusionsgesetz nach Fick beschrieben werden:

$$J_D = \frac{dm}{dt} = \frac{D \cdot A}{S} \cdot (C_p - C_D)$$

J_D = Diffusionsstrom

m = transportierte Stoffmenge

t = Zeit

D = Diffusionskoeffizient

A = Fläche, über die Stoffaustausch stattfindet

S = Strecke, über die Stoffaustausch stattfindet

C_p = Stoffkonzentration im Plasma

C_D = Stoffkonzentration im Dialysat

Die weiteren Erfahrungen bei der Weiterentwicklung der Techniken der Leberdialyse für den klinischen Einsatz führten in den letzten Jahren zur Revidierung der Vorstellungen über Transportmechanismen der Albumindialyse. Es wurden unterschiedliche Faktoren, die diesen Stofftransport beeinflussen könnten, untersucht, unter anderem:

Anwendung der semipermeablen Membran, welche den Übertritt von proteingebundenen Substanzen ohne den Verlust von Albumin erlaubt.

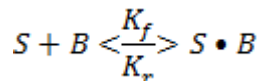
Bei einer konventionellen Dialyse ohne Albumin im Dialysat können nur Spuren der albumingebundenen Stoffe nach dem Dialysevorgang im Dialysat nachgewiesen werden.

Eine Erhöhung der Albuminkonzentrationen im Dialysat kann die Effektivität des Stofftransports über die Membran in gewissem Maße steigern.

Eine Affinität der jeweiligen Substanz zum Albumin spielt eine wichtige Rolle bei der Leberdialyse. Die Liganden mit niedrigerer Affinität zum Albumin lassen sich besser dialysieren.

Eine Albumindialyse ohne einen direkten Kontakt des Blutes mit einem Adsorber hat zwar eine etwas geringere Entgiftungskapazität, führt jedoch nicht zum Verlust körpereigener, essentieller Substanzen wie Gerinnungsfaktoren, Hormone etc.

John Patzer widmet sich in seiner Veröffentlichung „Principles of Bound Solute Dialysis“ den theoretischen Grundlagen der albuminbasierten Blutreinigungsverfahren und beschreibt Dialyse mit einem Binder (Albumin) im Dialysat als einen thermodynamischen Prozess. Dieser Prozess kann durch folgende Formeln widerspiegelt werden:



Dabei bildet S (Toxin) einen Komplex mit einem Bindemittel B (Albumin), K_f ist die Konstante für die Bildung der Komplexe und K_r ist die Konstante für die Dissoziation des Komplexes. Die Affinität eines Toxins zum Binder (Albumin) wird durch eine Bindungskonstante dargestellt:

$$K_b = \frac{K_f}{K_r} = \frac{C_{(S \cdot B)}}{C_S C_B}$$

C bezieht sich auf die Konzentration der jeweiligen Substanz. Viele Toxine haben eine extrem hohe Affinität für Albumin (siehe Tabelle 1), die stark die Konzentration der frei gelösten Form reduziert und damit die Elimination eines Toxins erschwert (z. B. unkonjugiertes Bilirubin verfügt über eine hohe Affinität zum Albumin mit $K_b = 0,5-5,0 \times 10^7$).

Tabelle 12 Affinität der verschiedenen Exo- und Endotoxine zum Albumin [143]:

Affinität zum Albumin	
Toxin	K_b , L/mol
Kupfer	$1,3 \times 10^{11}$
Unkonjugiertes Bilirubin	$0,5-5,0 \times 10^7$
Gallensäuren	
Cholinsäure	4×10^2

Lithocholinsäure	2×10^4
Medikamente	
Digitoxin	$1,8 \times 10^4$
Warfarin	2×10^5
Naproxen	$2,5 \times 10^6$

Die theoretische Verbesserung der Clearance von Toxinen im Rahmen der Albumindialyse ist laut J. Patzer von dem Verhältnis Dialysat-Geschwindigkeit/Blutfluss-Geschwindigkeit abhängig ($\alpha = Q_d/b$, dabei ist Q_d oder b die Geschwindigkeit der Dialysat- oder Blutpumpe in ml/min). Je höher dieser Koeffizient, desto besser die Clearance. Ebenso wird die Clearance von dem Verhältnis Diffusionskoeffizient/Blutfluss-Geschwindigkeit beeinflusst ($k = KA/b$, wobei KA die Diffusionskonstante eines Dialysefilters und Q_b die Geschwindigkeit der Blutpumpe bezeichnet; je höher, desto besser die Engiftungskapazität). Die Gabe eines Akzeptormoleküls zur Dialysatlösung führt zur eindeutigen Verbesserung der Elimination der Substanzen mit hoher Affinität zum Albumin wie z. B. unkonjugiertes Bilirubin mit K_b von $0,5-5,0 \times 10^7$, weniger von mit Albumin kovalent gebundenen Substanzen wie Gallensäuren mit $K_b \sim 10^4$. Laut Patzer kann die klinische Effizienz der Albumindialyse durch folgende Maßnahmen verbessert werden [143, 145]:

Anwendung eines Dialysefilters, dessen Membran nicht durchlässig für Albumin ist.

Dialyse mit der minimalen Blutflussrate.

Gleichzeitige Optimierung des Verhältnisses Dialysatrate/Blutflussrate (α).

Die Dialysatflussrate soll so hoch wie möglich gehalten werden.

Die Benutzung von Membranen mit hoher Permeabilität.

5.3 Direkter Vergleich der Single Pass Albumin Dialysis (SPAD) mit dem Molecular Adsorbent Recirculation System (MARS).

Das Konzept der Albumin-Dialyse wurde ausgiebig in den letzten zehn Jahren untersucht. Die meisten Studien beschäftigten sich mit der klinischen Applikation der maschinellen Leberunterstützung im akuten Leberversagen oder bei akuter Dekompensation eines chronischen Leberversagens. Die Datenlage bezüglich der Auswirkungen der verschiedenen technischen Aspekte auf das Endergebnis der Behandlung ist leider unzureichend. Das Ziel vieler In-vitro-Studien war die Bewertung der Entgiftungskapazität sowie ein Vergleich der maschinellen Dialysesysteme in unterschiedlicher technischer Ausführung. Es wurde dabei die Clearance-Rate für albumingebundene Toxine sowie wasserlösliche Toxine berücksichtigt, und die kommerziell hergestellten Systeme wurden entsprechend in größerem Ausmaß untersucht.

Die meisten maschinellen Leberersatzverfahren sind albuminbasiert und verursachen dadurch sehr hohe Behandlungskosten. Der Preis für ein Gramm des Humanalbumins 20 % liegt zwischen 3,50-5,0 €. Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte In-vitro-Studie aus dem Jahr 2004 zeigte, dass für eine siebenstündige Behandlung mit dem MARS-System ungefähr 300 € für 600 ml Humanalbumin 20 % ausgegeben werden müssen. Für die Therapie gleicher Dauer mit der SPAD-Methode benötigte man für den Aufbau ca. 500 € für 1000 ml Humanalbumin 20 %, um eine 4,4%ige Konzentration des Albumins im Dialysat zu erreichen. Der Betrag, der für die Albuminlösung veranschlagt war, wurde mit den Kosten für die verwendeten Verbrauchsmaterialien addiert. Dies zeigte, dass eine SPAD-Behandlung, verglichen mit einer ähnlich effektiven MARS-Behandlung, nur 30 % der Kosten verursacht [128].

Es wurde dabei für die Ausrechnung der anfallenden Summen ein relativ niedriger Preis von 2,5 EURO/g Humanalbumin genommen. In späteren Studien der gleichen Arbeitsgruppe (Sauer et al.) wurde bewiesen, dass die Reduktion der Albuminkonzentration in der Dialysatflüssigkeit von 4,4 % bis auf 3 % mit keinem Effektivitätsverlust hinsichtlich der Detoxifikation verbunden ist. Allein dadurch konnte man eine deutliche Senkung des Albuminverbrauchs im Rahmen der SPAD-Behandlung und der damit verbundenen finanziellen Ausgaben erzielen. Die Studienergebnisse sind noch nicht veröffentlicht worden.

In der oben erwähnten In-vitro-Studie von Sauer et al. zum Vergleich von MARS und SPAD wurde festgestellt, dass die Entgiftungskapazität von SPAD ähnlich hoch oder sogar höher als die von MARS ist [128]. Insbesondere Ammoniak und Bilirubin wurden effizienter entfernt. Es haben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Elimination der anderen wasserlöslichen Substanzen oder Gallensäuren ergeben.

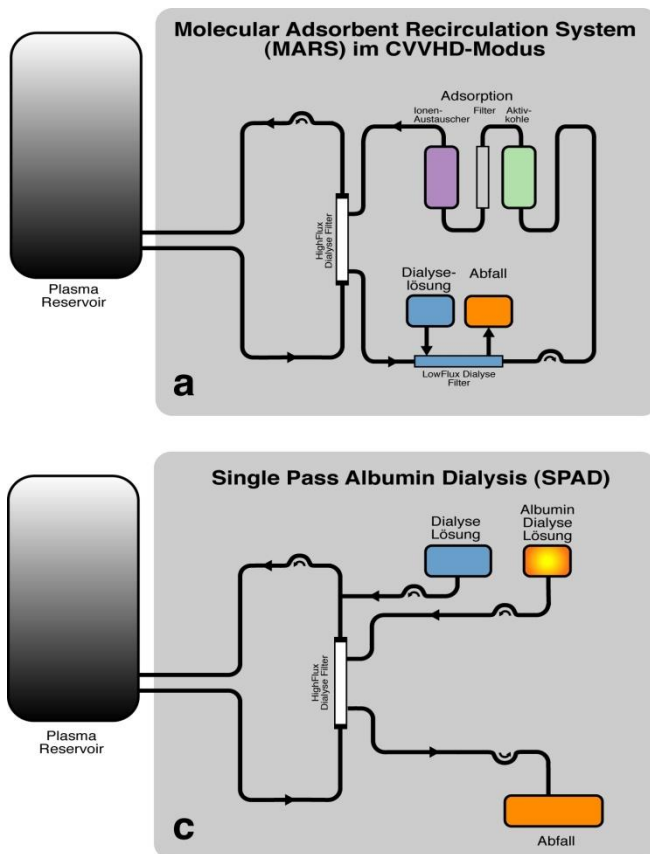


Abbildung 16 Schematische Darstellung von MARS- und SPAD-Aufbau (Sauer et al.).

In einer ähnlichen In-Vitro-Studie von P. Peszynski et al., in welcher die beiden Methoden MARS und SPAD verglichen wurden, zeigte sich im Gegenteil eine bessere Elimination von klinisch relevanten Substanzen wie Gallensäuren während der MARS-Behandlung [125].

Die aktuelle Studie aus Rostock von Mitzner et al. widmet sich dem Einfluss der Albuminkonzentration im Dialysat auf die Entgiftungskapazität des MARS-Konzepts im Vergleich mit der SPAD-Methode [146]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass, wenn eine Humanalbuminkonzentration von 4-5 % im MARS-Kreislauf verwendet wird, die proteingebundenen Toxine langsamer eliminiert werden als in den Versuchsreihen mit höheren Humanalbuminkonzentrationen im Dialysat. Gleichzeitig wird betont, dass bei der SPAD-Behandlung deutlich niedrigere Konzentrationen (üblicherweise unter 4 %) von Humanalbumin verwendet werden. Außerdem zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die übliche, vom

Hersteller empfohlene Albuminkonzentration von 100-120 g (entsprechend 500-600 ml 20 % Humanalbumin) in dem MARS-Kreislauf effizienter ist als SPAD mit einer Konzentration von Humanalbumin im Dialysat von 4-5 % hinsichtlich der Eliminierung von solchen Substanzen wie Gallensäuren und Diazepam. Es ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede der Bilirubinelimination im Vergleich zur SPAD-Behandlung. Als Ursache dafür wird die Verwendung des unkonjugierten Bilirubins in den In-Vitro-Tests gesehen. Die Albuminkonzentration in dem MARS-Albuminkreislauf hat einen bedeutenden Einfluss auf die Eliminierung von Diazepam sowie Gallensäuren. Eine Erhöhung der Clearance für diese Substanzen kann durch die Erhöhung der Albuminkonzentration auf bis zu 400 ml 25 % Humanalbumin erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Albuminkonzentration verursacht keine weitere Verbesserung der Eliminierung der beiden Markersubstanzen [146, 147].

Es fehlen zwar kontrollierte randomisierte Studien, jedoch gibt es zahlreiche Case Reports, die die Wirksamkeit der SPAD bestätigen. Zu diesen zählt auch die Veröffentlichung aus dem Jahr 2005 „Modification of continuous venovenous hemodiafiltration with single-pass albumin dialysate allows for removal of serum bilirubin“ [147]. Berichtet wurde über die erfolgreiche Behandlung einer 53-jährigen Frau mit Nierenversagen und schwerer Hyperbilirubinämie nach subtotaler Kolektomie bei ischämischer Kolitis. Um eine Eliminierung des Bilirubins zu erreichen, wurde eine 25%-Albuminlösung mit einem herkömmlichen Dialysat vermischt, um eine Konzentration von 1,85 % bzw. 5,0 % Albumin im Dialysat zu bekommen. Die Patientin erhielt entsprechend insgesamt zwei Zyklen von Single Pass Albumin Dialysis mit 1,85 % und 5,0 % Albuminkonzentration im Dialysat. Es wurde der Bilirubinspiegel vor und nach der Behandlung gemessen, dieser betrug 50,4 mg/dl (862 µmol/L) und 39,0 mg/dl (667 µmol/L) mit 1,85 % Albuminkonzentration im Dialysat und 47,1 mg/dl (805 µmol/L) und 39,7 mg/dl (679 µmol/L) mit 5,0 % Albuminkonzentration im Dialysat. Außerdem wurde der Bilirubingehalt im Filtratbeutel nach der konventionellen sowie nach der Albumindialyse bestimmt. Die Konzentration des Bilirubins im Filtratbeutel nach Albumindialyse mit 1,85 % Albuminkonzentration in der Dialysatlösung erhöhte sich auf 1,37 +/- 0,06 mg/dl (23 +/- 1 µmol/l) bei 1,85 % Albumin im Dialysat und auf 1,38 +/- 0,15 mg/dl (24 +/- 3 µmol/l) bei 5,0%iger Konzentration. Im Gegensatz dazu stieg der Bilirubingehalt im Filtratbeutel nach herkömmlicher Dialyse nur auf 0,3 mg/dl (5 µmol/l) an. Dieser Erfahrungsbericht bestätigte nicht nur die Effektivität der Albumindialyse in Kombination mit herkömmlichen Nierenersatzverfahren für die Behandlung eines hepatorenalen Syndroms, sondern bestätigte

auch in vivo die These von John Patzer bezüglich der ausreichenden Effizienz der Albumindialyse mit niedrigen Albuminkonzentrationen im Dialysat von 1-2 % [143, 145, 147].

5.4. Indikationsstellung zur Durchführung einer maschinellen Leberunterstützung

Bezug nehmend auf immense Kosten, die durch Leberersatzverfahren entstehen können, ist es erforderlich genaue Leitlinien zur Indikationsstellung solcher Therapien zu entwickeln. Die Datenlage bietet leider derzeit nur kontrollierte Studien mit sehr kleinen Fallzahlen. Eine Senkung der Mortalität konnte nicht nachgewiesen werden.

Sowohl für die Lebertransplantation als auch für die Leberunterstützungstherapie ist eine geeignete Risikogruppenstratifizierung erforderlich.

Es existieren derzeit etablierte Scoringsysteme, z. B. Child-Pugh-Score und MELD-Score, die zumindest eine grobe Aussage über einen möglichen Erfolg der Behandlung erlauben.

Der Child-Pugh-Score (oder Child-Turcotte) ist eine Klassifikation, die die Leberzirrhose in drei Stadien einteilt, wobei eine hohe Punktzahl eine schwer eingeschränkte Leberleistung kennzeichnet. Es wird anhand von fünf Kriterien (drei Laborwerte und zwei klinische Befunde: Gesamtbilirubin, Serum-Albumin, INR, Aszites und Stadium der Enzephalopathie) eine Gesamtpunktzahl erstellt, wobei jeweils 1 bis 3 Punkte vergeben werden, sodass ein Score von 5 bis 15 erreicht werden kann. Bei Vorliegen einer der cholestatischen Lebererkrankungen, z. B. primär biliäre Zirrhose (PBC) oder primär sklerosierende Cholangitis (PSC) gelten andere Referenzbereiche für das Bilirubin: 1 Punkt: Bilirubin < 4,0 mg/dl; 2 Punkte: 4-10 mg/dl; 3 Punkte > 10,0 mg/dl.

Die Child-Pugh-Kriterien wurden 1964 von Dr C.G. Child und Dr J.G. Turcotte (Universität von Michigan) vorgeschlagen und 1972 von Pugh modifiziert. Die Child-Pugh-Kriterien wurden später mit dem MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease) ersetzt. Der MELD-Score basiert auf drei Laborparametern: Bilirubin, Kreatinin und INR. Der MELD-Score wird mittels folgender Formel, die von Wissenschaftlern der Mayo-Klinik entwickelt wurde, berechnet: $10 \{0.957 \ln(\text{Serumkreatinin}) + 0.378 \ln(\text{Bilirubin ges.}) + 1.12 \ln(\text{INR}) + 0.643\}$

Der daraus errechnete Wert kann von 6 (leichte Erkrankung) bis 40 (schwere Erkrankung) reichen. Patienten mit einem Score < 9 zeigten in einer Studie (Wiesner et al.) eine 3-Monats-

Mortalität von 1,9 %, während ein Score von 40 mit einer 3-Monats-Mortalität von 71,3 % verbunden war.

Die Bilirubinwerte über 12 mg/dl (Überlebenszeit < 3 Monate) sind im Vergleich zu 4 mg/dl (Überlebenszeit > 3 Monate) mit einer deutlich verringerten Überlebenszeit verbunden [148].

Zusammengefasst gesagt fehlen Studien, die anhand von Scoringsystemen den Therapiebeginn bestimmen und versuchen eine Prognose bezüglich der Effektivität der Behandlung zur ermöglichen. Mit anderen Worten: Für eine erfolgreiche klinische Anwendung der extrakorporalen Leberunterstützung braucht man Vorgaben, wann man mit einer solchen Behandlung anfangen soll und ab welchem Zeitpunkt der Erfolg der Therapie als aussichtslos erscheint.

5.5. Markersubstanzen für die Einschätzung der Entgiftungskapazität der Leberunterstützungssysteme

In der heutigen Zeit sind Bilirubin und Kreatinin (oder Ammoniak in unserer Studie) Parameter, die zumindest annäherungsweise die Einschätzung der Detoxifikationskapazität der Leberersatztherapie ermöglichen.

Als Markersubstanz für die Beurteilung des Detoxifizierungspotenzials der Leberunterstützungssysteme hinsichtlich der Elimination wasserunlöslicher Stoffe wird Bilirubin favorisiert. Das Bilirubin ist an sich wasserunlöslich. Im Blut wird Bilirubin an das Albumin gebunden und bis zur Leber transportiert, wo es in die Hepatozyten aufgenommen und verstoffwechselt wird. Der größte Teil des Bilirubins wird mit Glucuronsäure konjugiert und in dieser konjugierten, wasserlöslichen Form mit der Galle in den Darm sezerniert. Im Dickdarm erfolgt der Umbau des Bilirubins schrittweise in Urobilinogen und Sterkobilinogen. Letzteres wird im Darm in Sterkobilin umgewandelt, das für die braune Farbe des Stuhls verantwortlich ist. Bilirubin und seine Metaboliten werden zu etwa 15 bis 20 Prozent im Darm wieder resorbiert und gelangen über das Blutsystem zurück zur Leber, was als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet wird. Ein kleiner Teil des Bilirubins wird über die Nieren in Form von Urobilin ausgeschieden.

Es werden unterschiedliche Fraktionen des Bilirubins im Serum unterschieden. Als indirektes Bilirubin wird die unkonjugierte, wasserunlösliche, an Albumin gebundene Form bezeichnet. Als direktes Bilirubin wird konjugiertes Bilirubin bezeichnet. Als Delta-Bilirubin wird die wasserlösliche, an Albumin kovalent gebundene Form bezeichnet. Üblicherweise wird der Gesamtgehalt des Bilirubins im Serum, der alle Fraktionen umfasst, bestimmt. Das indirekte Bilirubin kann dann als Differenz zwischen dem Gesamtgehalt und dem direkten Bilirubin errechnet werden.

Das unkonjugierte Bilirubin ist die Substanz, die die höchste Affinität zum Albumin hat [143]. Die übliche Zusammensetzung des Gesamtbilirubins im Serum eines Patienten entspricht meistens einer Komposition aus konjugiertem (was auch albumingebunden ist, jedoch mit weniger Affinität zum Albumin), unkonjugiertem und Delta-Bilirubin [149-151].

In unserer In-vitro-Studie wurde das unkonjugierte Bilirubin benutzt. Allein aus diesem Grund kann man nur bedingt die Ergebnisse eines In-vitro-Experiments mit In-vivo-Daten vergleichen.

5.6 Das Humanalbumin als Adsorber für Endo- und Exotoxine. Physiologische und chemische Eigenschaften des Albuminmoleküls.

Humanes Albumin wird seit ca. 100 Jahren in der Medizin benutzt und wurde initial durch Militärmediziner bei Soldaten mit hohen Blutverlusten durch Kriegsverletzungen angewandt.

Humanalbumin gehört zur Gruppe der globulären Proteine und wird ausschließlich in der Leber synthetisiert (ca. 200 mg/kg pro Tag). Die Albuminsynthese wird durch einen kolloidosmotischen Druck in der Leber reguliert. Eine exogene Zufuhr der natürlichen oder künstlichen Kolloide führt zur Hemmung der Albuminsynthese. Das Humanalbumin hat eine Molekülmasse von etwa 66 kDa und besteht aus 584 Aminosäuren. Die Albuminkonzentration des menschlichen Plasmas beträgt ca. 3,5-4,5 g/dl und macht 60 % des gesamten Plasmaproteins aus. Im intravasalen Raum befinden sich etwa 30-40 % des Albumins, was 120 g auf 3 l Plasmavolumen entspricht. Die interstitielle Konzentration des Albumins ist wesentlich geringer.

Albumin ist wasserlöslich. Seine Bindungskapazität für Wasser beträgt ca. 18 ml/g, seine intravasale Verweildauer vier Stunden. Das Humanalbumin hat eine In-vivo-Halbwertszeit von 8 bis 21 Tagen. Der isoelektrische Punkt liegt zwischen pH 4,6 und 5,4. Das Albumin ist im Bereich des physiologischen pH-Wertes des Blutes stark negativ beladen und aufgrund seiner

hohen Nettoladung verfügt die Substanz über eine hervorragende Bindungskapazität für Wasser, Calcium, Natrium, Spurenelemente sowie Fettsäuren, Bilirubin, Hormone und exogene Toxine, Medikamente. Momentan ist keine andere Substanz auf dem Markt, die die Bindungseigenschaften des Albumins ersetzen kann [152, 153].

Das Humanalbumin und dessen Eigenschaften wurden lange Zeit unterschätzt und hauptsächlich auf die Fähigkeit reduziert, den onkotischen Druck im Gefäßsystem aufrechtzuerhalten. Albumin kann nicht nur als Plasma-Expander, sondern auch als Toxinbinder und Radikalfänger benutzt werden [153]. Diese Substanz spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Plasmakonzentration verschiedener Substanzen, für die Koagulation sowie für die Mikrogefäßpermeabilität [154].

Der entscheidende Vorteil der Albumindialyse gegenüber Systemen, die durch den direkten Kontakt von künstlichen Absorbentien oder Aktivkohle mit Plasma oder Blut arbeiten, besteht darin, dass durch die oben genannten Charakteristiken des Albuminmoleküls und seiner Bindungsstellen eine selektive Entfernung von nichtwasserlöslichen Substanzen, die auch im Blut an Albumin gebunden sind, erfolgen kann.

6.0 Bewertung der Ergebnisse der aktuellen Studie

Das Konzept dieser Promotionsarbeit basiert auf der Vermutung, dass das Albumin als Trägermolekül für die beim Leberversagen relevanten Toxine beim Benutzen des herkömmlichen Dialyseverfahrens SPAD nach der einmaligen Passage des Filters verworfen wird, ohne komplett genutzt zu werden. Es wurde der Aufbau mit einer zusätzlichen Pumpe zur Rezirkulation der albuminhaltigen Dialyselösung erdacht, um diese Vermutung zu verifizieren. Die so entstandene Rezirkulation des Albumins könnte nach unserer Vermutung zu einer gesteigerten Effektivität des Systems und zu einer Kosteneinsparung aufgrund der besseren Ausnutzung des vorhandenen Albumins führen. Im Vordergrund dieser Studie stand eine Anpassung der Zirkulationsgeschwindigkeit der Albuminlösung.

Auf einer Seite konnte theoretische eine langsamere Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe mit einer damit verbundenen längeren Kontaktzeit zwischen Albumin auf der einen und den Toxinen bzw. toxinbeladenen Molekülen auf der anderen Membranseite des Filters effektiver

sein. Demgegenüber konnte es jedoch bei einer schnelleren Rezirkulationsgeschwindigkeit zur Zunahme der turbulenten Strömungen kommen. Daraufhin könnte eine bessere Verteilung der Albuminlösung zwischen den Filterfasern mit konsekutiver Erhöhung der Kontaktfläche der Membran und daraus resultierend eine Optimierung der Bilirubinelimination erreicht werden.

Der Gegenstand dieser Studie war es, diese Frage zu beantworten. Um den Einfluss der zusätzlichen Pumpe zu prüfen, wurden alle Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Für die bessere Vergleichbarkeit wurde die Rezirkulationsgeschwindigkeit der Geschwindigkeit der Blutpumpe (180 ml/min) angeglichen, halbiert (90 ml/min) oder um das 1,5-Fache erhöht (270 ml/min). Als Kontrolle wurden die Experimente ohne eine Rezirkulationspumpe durchgeführt, d. h. im SPAD-Modus.

Die Ausgangskonzentrationen der Giftstoffe im Plasma wurden vor dem Anfang der Behandlung bestimmt und betragen $17,06 \pm 0,4$ mg/dl Bilirubin; $235,6 \pm 14,4$ μ mol/l Ammoniak; $176,1 \pm 10,7$ mg/dl Harnstoff; $5,5 \pm 0,5$ mg/dl Kreatinin; $16,7 \pm 0,5$ μ mol/l Harnsäure; $176,06 \pm 10,7$ μ mol/l Harnstoff; Albumin $4,4 \pm 0,15$ mg/dl; Protein $5,2 \pm 0,3$ mg/dl (alle Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung). Als Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse galten die oben genannten Ausgangskonzentrationen für alle Aufbaumodi. Die Toxine wurden aufgrund unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften und Eliminationswege in zwei Gruppen eingeteilt: albumingebundene und wasserlösliche Toxine. Als Markersubstanz für die albumingebundenen Toxine wurde Bilirubin ausgewählt.

Die Testergebnisse zeigen, dass bei der Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe von 270 ml/min eine tendenziell etwas höhere Bilirubinreduktion zu sehen ist. Statistisch gesehen ergibt sich kein signifikanter Unterschied unter den verglichenen Versuchsreihen (p-Wert gleich 0,4520). Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen in den Versuchsserien können jedoch keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Signifikanz getroffen werden.

7.0 Thesen zur Dissertation.

- Eine statistisch signifikante Verbesserung der Entgiftungskapazität durch die Anwendung einer partiellen Zirkulation der albuminhaltigen Dialysatlösung konnte nicht nachgewiesen werden.

- Eine höhere Geschwindigkeit der Rezirkulationspumpe könnte eventuell zur besseren Eliminierung der albumingebundenen Toxine führen (siehe Abb. 9 a, c, e). Diese Studie konnte aufgrund unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen des Bilirubins in den Versuchsreihen keinen statistisch signifikanten Unterschied nachweisen. Ein steilerer Verlauf der Kurve der graphischen Darstellung der Bilirubinkonzentration kann durch eine vermutete effektivere Anwendung der Albuminmoleküle mit freien Bindungsstellen als Folge der partiellen Dialysatzirkulation erklärt werden. Eine weitere plausible Ursache dafür ist die Entstehung von Turbulenzen im Dialysatkompartiment in den Versuchen mit Anwendung der Rezirkulationspumpe. Diese kann theoretisch die Bildung einer Proteinschicht auf der Membranoberfläche, insbesondere im Bereich der Poren (bekannt aus der herkömmlichen Dialyse), vermindern und dadurch einen besseren Stofftransport zwischen den Albuminmolekülen des Plasmas und den Molekülen im Dialysat erleichtern.
- Eine geringgradige Albuminreduktion im Plasma in allen Versuchsreihen zeigt keine statistisch bedeutsamen Unterschiede und ist vermutlich auf die Adsorption der Albuminmoleküle auf der Membranoberfläche zurückzuführen.
- Es besteht weiterhin ein großer Bedarf an klinischen sowie experimentellen Studien auf dem Gebiet der Leberersatztherapie, vor allem für die Erhärtung der These der klinischen Wirksamkeit und für die Erwägung der wirtschaftlichen Zweckmäßigkeit dieser Art der Behandlung.
- Alle Versuchsreihen wurden mit Konzentration des Albumins von 3 % im Dialysat durchgeführt. Diese Konzentration ist niedriger als die üblichen Albuminkonzentrationen von 4-4,4 % im SPAD-Modus und 11,5 % bei der MARS-Behandlung. Eine Möglichkeit der Reduktion der Albuminkonzentration im Dialysat auf 3 % im SPAD-Modus ohne Verlust des Detoxifizierungspotenzials (3 % verglichen mit Konzentrationen < 3 % und > 3 %) wurde in einer In-vitro-Studie unserer Arbeitsgruppe bereits bewiesen. Die entsprechenden Ergebnisse sind noch nicht veröffentlicht. Eine weitere Senkung der Albuminkonzentration unter 3 % resultierte in einer Minderung der Entgiftungskapazität. In der Literatur wird auch über erfolgreiche SPAD-Anwendungen mit Albuminkonzentrationen im Dialysat von ca. 1 % auch im klinischen Einsatz berichtet.

- Eine Maximierung der Albuminausnutzung während des Dialysevorganges kann theoretisch durch eine kontinuierliche Zugabe der Albuminlösung direkt in die „Dialysatleitung“ über den Perfusor erfolgen. Dadurch soll eine konstante Konzentration des Albumins im Dialysat erreicht werden. In allen unseren In-vitro-Versuchen erfolgte die Albuminzufuhr auf diese Art und Weise.
- Um den Einfluss der Albuminzufuhr über Perfusor auf die Entgiftungskapazität der SPAD (im Vergleich zur konventionellen Mischung der beiden Lösungen von Humanalbumin und Dialysat) einschätzen zu können, ist eine weitere Studie erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Banares Canizares, R. and M.V. Catalina Rodriguez, *[Indications and therapeutic possibilities of albumin dialysis (MARS)]*. Rev Esp Enferm Dig, 2003. **95**(12): p. 876-89.
2. Sen, S., R. Williams, and R. Jalan, *Emerging indications for albumin dialysis*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(2): p. 468-75.
3. Shakil, A.O., et al., *Acute liver failure: clinical features, outcome analysis, and applicability of prognostic criteria*. Liver Transpl, 2000. **6**(2): p. 163-9.
4. Jalan, R. and R. Williams, *Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options*. Blood Purif, 2002. **20**(3): p. 252-61.
5. Rifai, K. and M.J. Bahr, *[Acute liver failure]*. Internist (Berl), 2003. **44**(5): p. 585-90, 592-8.
6. Boker, K.H., *[Acute liver failure]*. Internist (Berl), 2001. **42**(4): p. 545-54, 556-62.
7. O'Grady, J.G., *Pathogenesis of acute liver failure*. Trop Gastroenterol, 1996. **17**(4): p. 199-201.
8. Keays, R., et al., *Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial*. BMJ, 1991. **303**(6809): p. 1026-9.
9. Williams, R., *Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure*. Semin Liver Dis, 1996. **16**(4): p. 343-8.
10. Schiodt, F.V., et al., *Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States*. Liver Transpl Surg, 1999. **5**(1): p. 29-34.
11. Mazzanti, G., et al., *Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65**(4): p. 331-41.
12. Campo, J.V., et al., *Kava-induced fulminant hepatic failure*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2002. **41**(6): p. 631-2.
13. Vetter, J., *Toxins of Amanita phalloides*. Toxicol, 1998. **36**(1): p. 13-24.
14. James, L.P., et al., *Detection of acetaminophen protein adducts in children with*

- acute liver failure of indeterminate cause*. Pediatrics, 2006. **118**(3): p. e676-81.
15. Davern, T.J., 2nd, et al., *Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 687-94.
 16. Ostapowicz, G., et al., *Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States*. Ann Intern Med, 2002. **137**(12): p. 947-54.
 17. Canbay, A., et al., *Acute liver failure in a metropolitan area in Germany: a retrospective study (2002 - 2008)*. Z Gastroenterol, 2009. **47**(9): p. 807-13.
 18. Chalasani, N., et al., *Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States*. Gastroenterology, 2008. **135**(6): p. 1924-34, 1934 e1-4.
 19. Pathikonda, M. and S.J. Munoz, *Acute liver failure*. Ann Hepatol. **9**(1): p. 7-14.
 20. Lee, W.M., *Etiologies of acute liver failure*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(2): p. 142-52.
 21. Lee, W.M., *Liver failure and liver support*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(2): p. 135-6.
 22. Lee, W.M., et al., *Acute liver failure: Summary of a workshop*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1401-15.
 23. Squires, R.H., Jr., et al., *Acute liver failure in children: the first 348 patients in the pediatric acute liver failure study group*. J Pediatr, 2006. **148**(5): p. 652-658.
 24. Bucuvalas, J., N. Yazigi, and R.H. Squires, Jr., *Acute liver failure in children*. Clin Liver Dis, 2006. **10**(1): p. 149-68, vii.
 25. Squires, R.H., Jr., *Acute liver failure in children*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(2): p. 153-66.
 26. Sen, S., R. Williams, and R. Jalan, *The pathophysiological basis of acute-on-chronic liver failure*. Liver, 2002. **22 Suppl 2**: p. 5-13.
 27. Olson, J.C. and P.S. Kamath, *Acute-on-chronic liver failure: concept, natural history, and prognosis*. Curr Opin Crit Care. **17**(2): p. 165-9.
 28. Wasmuth, H.E., et al., *Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis*. J Hepatol, 2005. **42**(2): p. 195-201.
 29. Laleman, W., et al., *Effect of the molecular adsorbent recirculating system and Prometheus devices on systemic haemodynamics and vasoactive agents in patients with acute-on-chronic alcoholic liver failure*. Crit Care, 2006. **10**(4): p. R108.
 30. Moore, K., *Renal failure in acute liver failure*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. **11**(9): p. 967-75.
 31. Arroyo, V., et al., *Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis*. International Ascites Club. Hepatology, 1996. **23**(1): p. 164-76.
 32. Ruiz-del-Arbol, L., et al., *Circulatory function and hepatorenal syndrome in cirrhosis*. Hepatology, 2005. **42**(2): p. 439-47.
 33. Arroyo, V., J. Fernandez, and P. Gines, *Pathogenesis and treatment of hepatorenal syndrome*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(1): p. 81-95.
 34. Kurer, I., et al., *[Hepatorenal syndrome]*. Anaesthesist, 2006. **55**(1): p. 95-107; quiz 108-9.
 35. Butterworth, R.F., *The astrocytic ("peripheral-type") benzodiazepine receptor: role in the pathogenesis of portal-systemic encephalopathy*. Neurochem Int, 2000. **36**(4-5): p. 411-6.
 36. Pares, A., et al., *Albumin dialysis improves hepatic encephalopathy and decreases circulating phenolic aromatic amino acids in patients with alcoholic hepatitis and severe liver failure*. Crit Care, 2009. **13**(1): p. R8.

37. Haussinger, D., et al., *Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy*. Gastroenterology, 1994. **107**(5): p. 1475-80.
38. Ferenci, P., et al., *Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 716-21.
39. Stadlbauer, V., G.A. Wright, and R. Jalan, *Role of artificial liver support in hepatic encephalopathy*. Metab Brain Dis, 2009. **24**(1): p. 15-26.
40. Mitzner, S.R., et al., *Improvement of multiple organ functions in hepatorenal syndrome during albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system*. Ther Apher, 2001. **5**(5): p. 417-22.
41. Mitzner, S., et al., *Improvement in central nervous system functions during treatment of liver failure with albumin dialysis MARS--a review of clinical, biochemical, and electrophysiological data*. Metab Brain Dis, 2002. **17**(4): p. 463-75.
42. Looock, J., et al., *Amino acid dysbalance in liver failure is favourably influenced by recirculating albumin dialysis (MARS)*. Liver, 2002. **22 Suppl 2**: p. 35-9.
43. Hassanein, T.I., et al., *Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis*. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1853-62.
44. Wolf, H.K. and G.K. Michalopoulos, *Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression*. Hepatology, 1992. **15**(4): p. 707-13.
45. de Kneegt, R.J. and S.W. Schalm, *Fulminant hepatic failure: to transplant or not to transplant*. Neth J Med, 1991. **38**(3-4): p. 131-41.
46. Eichhorst, S.T., *Modulation of apoptosis as a target for liver disease*. Expert Opin Ther Targets, 2005. **9**(1): p. 83-99.
47. Neuman, M.G., *Apoptosis in liver disease*. Rom J Gastroenterol, 2002. **11**(1): p. 3-7.
48. Neuman, M.G., *Cytokines--central factors in alcoholic liver disease*. Alcohol Res Health, 2003. **27**(4): p. 307-16.
49. Barshes, N.R., et al., *Support for the acutely failing liver: a comprehensive review of historic and contemporary strategies*. J Am Coll Surg, 2005. **201**(3): p. 458-76.
50. Abouna, G.M., *Experience with extracorporeal pig liver perfusion in the treatment of hepatic coma*. Gut, 1968. **9**(6): p. 730-1.
51. Abouna, G.M., *Pig liver perfusion with human blood. The effect of preparing and flushing the liver with various balanced solutions on its subsequent viability and function*. Br J Surg, 1968. **55**(10): p. 761-8.
52. Abouna, G.M., et al., *Acute hepatic coma successfully treated by extracorporeal baboon liver perfusions*. Br Med J, 1972. **1**(5791): p. 23-5.
53. Drapanas, T., R. Zemel, and J.O. Vang, *Hemodynamics of the isolated perfused pig liver: metabolism according to routes of perfusion and rates of flow*. Ann Surg, 1966. **164**(3): p. 522-37.
54. Swift, J.E., W.R. Ghent, and I.T. Beck, *Direct transhepatic cross-circulation in hepatic coma in man*. Can Med Assoc J, 1967. **97**(24): p. 1435-45.
55. Rozga, J., *Liver support technology--an update*. Xenotransplantation, 2006. **13**(5): p. 380-9.
56. Stadlbauer, V., et al., *Artificial liver support systems in the management of complications of cirrhosis*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(1): p. 96-109.
57. Naruse, K., W. Tang, and M. Makuuch, *Artificial and bioartificial liver support: a*

- review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(10): p. 1516-21.
58. Wood, R.P., et al., *Extracorporeal liver assist device (ELAD): a preliminary report*. *Transplant Proc*, 1993. **25**(4 Suppl 3): p. 53-4.
 59. Sussman, N.L. and J.H. Kelly, *Extracorporeal liver support: cell-based therapy for the failing liver*. *Am J Kidney Dis*, 1997. **30**(5 Suppl 4): p. S66-71.
 60. Demetriou, A.A., et al., *Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure*. *Ann Surg*, 2004. **239**(5): p. 660-7; discussion 667-70.
 61. Sauer, I.M. and J.C. Gerlach, *Modular extracorporeal liver support*. *Artif Organs*, 2002. **26**(8): p. 703-6.
 62. Poyck, P.P., et al., *In vitro comparison of two bioartificial liver support systems: MELS CellModule and AMC-BAL*. *Int J Artif Organs*, 2007. **30**(3): p. 183-91.
 63. Patzer, J.F., 2nd, G.V. Mazariegos, and R. Lopez, *Preclinical evaluation of the Excorp Medical, Inc, Bioartificial Liver Support System*. *J Am Coll Surg*, 2002. **195**(3): p. 299-310.
 64. Mazariegos, G.V., et al., *First clinical use of a novel bioartificial liver support system (BLSS)*. *Am J Transplant*, 2002. **2**(3): p. 260-6.
 65. Nyberg, S.L., et al., *Evaluation of a hepatocyte-entrapment hollow fiber bioreactor: A potential bioartificial liver*. *Biotechnol Bioeng*, 1993. **41**(2): p. 194-203.
 66. Flendrig, L.M., et al., *In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates*. *J Hepatol*, 1997. **26**(6): p. 1379-92.
 67. Calise, F., et al., *Functional evaluation of the AMC-BAL to be employed in a multicentric clinical trial for acute liver failure*. *Transplant Proc*, 2001. **33**(1-2): p. 647-9.
 68. van de Kerkhove, M.P., et al., *Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver*. *Int J Artif Organs*, 2002. **25**(10): p. 950-9.
 69. Min, A.D. and N.D. Theise, *Prospects for cell-based therapies for liver disease*. *Panminerva Med*, 2004. **46**(1): p. 43-8.
 70. Soto-Gutierrez, A., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells to hepatocytes using deleted variant of HGF and poly-amino-urethane-coated nonwoven polytetrafluoroethylene fabric*. *Cell Transplant*, 2006. **15**(4): p. 335-41.
 71. Soto-Gutierrez, A., et al., *Construction and transplantation of an engineered hepatic tissue using a polyaminourethane-coated nonwoven polytetrafluoroethylene fabric*. *Transplantation*, 2007. **83**(2): p. 129-37.
 72. Schwartz, R.E., et al., *Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(10): p. 1291-302.
 73. Tung, L.C., et al., *[Experience in treating hepatic coma by extracorporeal liver perfusion (author's transl)]*. *Zentralbl Chir*, 1980. **105**(18): p. 1195-205.
 74. Rifai, K., et al., *[Liver replacement therapy. Reliable indications in acute liver failure]*. *Internist (Berl)*, 2003. **44**(12): p. 1485-90.
 75. Nyberg, S.L., et al., *Evolution of the bioartificial liver: the need for randomized clinical trials*. *Am J Surg*, 1993. **166**(5): p. 512-21.
 76. Rozga, J., et al., *Development of a hybrid bioartificial liver*. *Ann Surg*, 1993. **217**(5): p. 502-9; discussion 509-11.
 77. Neuzil, D.F., et al., *Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency*. *Surgery*, 1993. **113**(3): p. 340-3.

78. McKenzie, T.J., J.B. Lillegard, and S.L. Nyberg, *Artificial and bioartificial liver support*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(2): p. 210-7.
79. Millis, J.M., et al., *Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact*. Transplantation, 2002. **74**(12): p. 1735-46.
80. Ellis, A.J., et al., *Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure*. Hepatology, 1996. **24**(6): p. 1446-51.
81. Samuel, D., et al., *Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation*. Transplantation, 2002. **73**(2): p. 257-64.
82. Rozga, J., et al., *A bioartificial liver to treat severe acute liver failure*. Ann Surg, 1994. **219**(5): p. 538-44; discussion 544-6.
83. Watanabe, F.D., et al., *Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial*. Ann Surg, 1997. **225**(5): p. 484-91; discussion 491-4.
84. Chamuleau, R.A., *[Liver and artificial liver]*. Ned Tijdschr Geneeskd, 1998. **142**(23): p. 1300-5.
85. Nibourg, G.A., et al., *Liver progenitor cell line HepaRG differentiated in a bioartificial liver effectively supplies liver support to rats with acute liver failure*. PLoS One. **7**(6): p. e38778.
86. Gerlach, J.C., et al., *Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion*. Transplantation, 1994. **58**(9): p. 984-8.
87. Sauer, I.M., et al., *Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells*. Xenotransplantation, 2003. **10**(5): p. 460-9.
88. Kiley, J.E., et al., *Ammonia intoxication treated by hemodialysis*. N Engl J Med, 1958. **259**(24): p. 1156-61.
89. Kiley, J.E., et al., *Acute renal insufficiency: hypermetabolic state developing after seven dialyses*. N Y State J Med, 1958. **58**(24): p. 4065-7.
90. Opolon, P., et al., *Hepatic failure coma (HFC) treated by polyacrylonitrile membrane (PAN) hemodialysis (HD)*. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1976. **22**: p. 701-10.
91. Denis, J., et al., *Treatment of encephalopathy during fulminant hepatic failure by haemodialysis with high permeability membrane*. Gut, 1978. **19**(9): p. 787-93.
92. Opolon, P., *High-permeability membrane hemodialysis and hemofiltration in acute hepatic coma: experimental and clinical results*. Artif Organs, 1979. **3**(4): p. 354-60.
93. Yoshida, M., et al., *Hemodiafiltration treatment of deep hepatic coma by protein passing membrane: case report*. Artif Organs, 1986. **10**(5): p. 417-9.
94. Sabin, S. and J.A. Merritt, *Treatment of hepatic coma in cirrhosis by plasmapheresis and plasma infusion (plasma exchange)*. Ann Intern Med, 1968. **68**(1): p. 1-7.
95. Linenberger, M.L. and T.H. Price, *Use of cellular and plasma apheresis in the critically ill patient: Part II: Clinical indications and applications*. J Intensive Care Med, 2005. **20**(2): p. 88-103.
96. Usami, M., et al., *Therapeutic plasmapheresis for liver failure after hepatectomy*. ASAIO Trans, 1989. **35**(3): p. 564-7.
97. Munoz, S.J., et al., *Perioperative management of fulminant and subfulminant hepatic failure with therapeutic plasmapheresis*. Transplant Proc, 1989. **21**(3): p. 3535-6.
98. Riviello, J.J., Jr., et al., *Value of plasmapheresis in hepatic encephalopathy*.

- Pediatr Neurol, 1990. **6**(6): p. 388-90.
99. Jander, S., J. Bischoff, and B.G. Woodcock, *Plasmapheresis in the treatment of Amanita phalloides poisoning: II. A review and recommendations*. Ther Apher, 2000. **4**(4): p. 308-12.
 100. Singer, A.L., et al., *Role of plasmapheresis in the management of acute hepatic failure in children*. Ann Surg, 2001. **234**(3): p. 418-24.
 101. Lepore, M.J. and A.J. Martel, *Plasmapheresis with plasma exchange in hepatic coma. Methods and results in five patients with acute fulminant hepatic necrosis*. Ann Intern Med, 1970. **72**(2): p. 165-74.
 102. Lepore, M.J., et al., *Fulminant hepatitis with coma successfully treated by plasmapheresis and hyperimmune Australia-Antibody-rich plasma*. Am J Gastroenterol, 1972. **58**(4): p. 381-9.
 103. Franz, H.R., et al., *[10 years plasma exchange with the IBM (Cobe) 2997]*. Beitr Infusionsther, 1990. **26**: p. 147-9.
 104. Willson, R.A., et al., *Rapid removal of paracetamol by haemoperfusion through coated charcoal. In vivo and in-vitro studies in the pig*. Lancet, 1973. **1**(7794): p. 77-9.
 105. Weston, M.J., et al., *Effects of haemoperfusion through charcoal or XAD-2 resin on an animal model of fulminant liver failure*. Gut, 1974. **15**(6): p. 482-6.
 106. Chang, T.M., *Experimental artificial liver support with emphasis on fulminant hepatic failure: concepts and review*. Semin Liver Dis, 1986. **6**(2): p. 148-58.
 107. Williams, R., *The elusive goal of liver support--quest for the Holy Grail*. Clin Med, 2006. **6**(5): p. 482-7.
 108. Weston, M.J., et al., *Platelet function in fulminant hepatic failure and effect of charcoal haemoperfusion*. Gut, 1977. **18**(11): p. 897-902.
 109. O'Grady, J.G., et al., *Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure*. Gastroenterology, 1988. **94**(5 Pt 1): p. 1186-92.
 110. Ash, S.R., et al., *Clinical effects of a sorbent suspension dialysis system in treatment of hepatic coma (the BioLogic-DT)*. Int J Artif Organs, 1992. **15**(3): p. 151-61.
 111. Ash, S.R., et al., *Effect of sorbent-based dialytic therapy with the BioLogic-DT on an experimental model of hepatic failure*. ASAIO J, 1993. **39**(3): p. M675-80.
 112. Hughes, R.D., et al., *Evaluation of the BioLogic-DT sorbent-suspension dialyser in patients with fulminant hepatic failure*. Int J Artif Organs, 1994. **17**(12): p. 657-62.
 113. Ash, S.R., et al., *Push-pull sorbent based pheresis for treatment of acute hepatic failure: the BioLogic-detoxifier/plasma filter System*. ASAIO J, 1998. **44**(3): p. 129-39.
 114. Ellis, A.J., et al., *Temporary extracorporeal liver support for severe acute alcoholic hepatitis using the BioLogic-DT*. Int J Artif Organs, 1999. **22**(1): p. 27-34.
 115. Wilkinson, A.H., S.R. Ash, and A.R. Nissenon, *Hemodiabsorption in treatment of hepatic failure*. J Transpl Coord, 1998. **8**(1): p. 43-50.
 116. Rifai, K., et al., *Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure*. J Hepatol, 2003. **39**(6): p. 984-90.
 117. Rifai, K., et al., *Removal selectivity of Prometheus: a new extracorporeal liver support device*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(6): p. 940-4.
 118. Rifai, K., C. Tetta, and C. Ronco, *Prometheus: from legend to the real liver support therapy*. Int J Artif Organs, 2007. **30**(10): p. 858-63.

119. Falkenhagen, D., et al., *Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances*. Artif Organs, 1999. **23**(1): p. 81-6.
120. Kribben, A., et al., *Effects of fractionated plasma separation and adsorption on survival in patients with acute-on-chronic liver failure*. Gastroenterology. **142**(4): p. 782-789 e3.
121. Stange, J., et al., *Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins*. Artif Organs, 1993. **17**(9): p. 809-13.
122. Mitzner, S.R., et al., *Albumin dialysis MARS: knowledge from 10 years of clinical investigation*. ASAIO J, 2009. **55**(5): p. 498-502.
123. Mitzner, S.R., et al., *Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial*. Liver Transpl, 2000. **6**(3): p. 277-86.
124. Kreymann, B., et al., *Albumin dialysis: effective removal of copper in a patient with fulminant Wilson disease and successful bridging to liver transplantation: a new possibility for the elimination of protein-bound toxins*. J Hepatol, 1999. **31**(6): p. 1080-5.
125. Peszynski, P., et al., *Albumin dialysis: single pass vs. recirculation (MARS)*. Liver, 2002. **22 Suppl 2**: p. 40-2.
126. Mitzner, S., et al., *Albumin regeneration in liver support-comparison of different methods*. Ther Apher Dial, 2006. **10**(2): p. 108-17.
127. Koball, S., et al., *Treatment of thyrotoxic crisis with plasmapheresis and single pass albumin dialysis: a case report*. Artif Organs. **34**(2): p. E55-8.
128. Sauer, I.M., et al., *In vitro comparison of the molecular adsorbent recirculation system (MARS) and single-pass albumin dialysis (SPAD)*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1408-14.
129. Al-Chalabi, A., et al., *A model of ischemic isolated acute liver failure in pigs: standardizing monitoring and treatment*. Eur Surg Res. **45**(2): p. 86-97.
130. Hirasawa, H., *Indications for blood purification in critical care*. Contrib Nephrol. **166**: p. 21-30.
131. Rifai, K., *Extracorporeal albumin dialysis*. Hepatol Res, 2008. **38**(s1The 6 Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Liver Failure: Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September 2007, Iwate, Japan): p. S41-S45.
132. Koivusalo, A.M., et al., *Albumin dialysis has a favorable effect on amino acid profile in hepatic encephalopathy*. Metab Brain Dis, 2008. **23**(4): p. 387-98.
133. Wang, M.M., et al., *Liver support therapy with molecular adsorbents recirculating system in liver failure: a summary of 252 cases from 14 centers in China*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(21): p. 2197-201.
134. Inoue, K., et al., *Artificial liver support system using large buffer volumes removes significant glutamine and is an ideal bridge to liver transplantation*. Transplant Proc, 2009. **41**(1): p. 259-61.
135. Rifai, K., *[Liver dialysis]*. Dtsch Med Wochenschr, 2005. **130 Suppl 5**: p. S235-7.
136. O'Grady, J.G. and R. Williams, *Management of acute liver failure*. Schweiz Med Wochenschr, 1986. **116**(17): p. 541-4.
137. O'Grady, J.G. and R. Williams, *Acute liver failure*. Baillieres Clin Gastroenterol, 1989. **3**(1): p. 75-89.
138. Iwata, H. and Y. Ueda, *Pharmacokinetic considerations in development of a bioartificial liver*. Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(4): p. 211-25.
139. Strain, A.J. and J.M. Neuberger, *A bioartificial liver--state of the art*. Science,

2002. **295**(5557): p. 1005-9.
140. Stange, J., et al., *Liver support by extracorporeal blood purification: a clinical observation*. Liver Transpl, 2000. **6**(5): p. 603-13.
 141. Di Nicuolo, G., et al., *No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver*. Xenotransplantation, 2005. **12**(4): p. 286-92.
 142. Pless, G. and I.M. Sauer, *Bioartificial liver: current status*. Transplant Proc, 2005. **37**(9): p. 3893-5.
 143. Patzer, J., *Principles of bound solute dialysis*. Ther Apher Dial, 2006. **10**(2): p. 118-24.
 144. Awad, S.S., et al., *Characteristics of an albumin dialysate hemodiafiltration system for the clearance of unconjugated bilirubin*. ASAIO J, 1997. **43**(5): p. M745-9.
 145. Patzer, J.F., 2nd and S.E. Bane, *Bound solute dialysis*. ASAIO J, 2003. **49**(3): p. 271-81.
 146. Drexler, K., et al., *Albumin dialysis molecular adsorbents recirculating system: impact of dialysate albumin concentration on detoxification efficacy*. Ther Apher Dial, 2009. **13**(5): p. 393-8.
 147. Chawla, L.S., et al., *Modification of continuous venovenous hemodiafiltration with single-pass albumin dialysate allows for removal of serum bilirubin*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(3): p. e51-6.
 148. Wiesner, R., et al., *Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers*. Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 91-6.
 149. Owens, D., E.A. Jones, and E.R. Carson, *Studies on the kinetics of unconjugated [¹⁴C]bilirubin metabolism in normal subjects and patients with compensated cirrhosis*. Clin Sci Mol Med, 1977. **52**(6): p. 555-70.
 150. Watson, D., *Bilirubin metabolism in disease*. Australas Ann Med, 1963. **12**: p. 53-69.
 151. Watson, D. and J.A. Rogers, *A study of six representative methods of plasma bilirubin analysis*. J Clin Pathol, 1961. **14**: p. 271-8.
 152. Emerson, T.E., Jr., *Unique features of albumin: a brief review*. Crit Care Med, 1989. **17**(7): p. 690-4.
 153. Holt, M.E., M.E. Ryall, and A.K. Campbell, *Albumin inhibits human polymorphonuclear leucocyte luminol-dependent chemiluminescence: evidence for oxygen radical scavenging*. Br J Exp Pathol, 1984. **65**(2): p. 231-41.
 154. Beck, R., et al., *Modulation of arachidonic acid release and membrane fluidity by albumin in vascular smooth muscle and endothelial cells*. Circ Res, 1998. **83**(9): p. 923-31.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Denis Alekseev, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In- vitro- evaluation der Open Loop Albumin Dialysis (OLAD)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Henstedt-Ulzburg, den 16.12.2013

Alekseev Denis

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.