

Aus der Klinik und Poliklinik
für Innere Medizin II
der Universität Rostock

Direktor: Herr Professor Dr. med. habil. Emil C. Reisinger

**Zytotoxizitätstest zur Ermittlung der Leberfunktion
auf der Basis humaner Hepatozyten (Biosensor)
bei septischen Patienten:
Ergebnisse einer Pilotstudie**

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

Vorgelegt von Cristof Haubner
geboren am 25. Oktober 1965 in Cloppenburg
aus Rostock

ROSTOCK, 2010

Dekan der Medizinischen Fakultät: Herr Prof. Dr. med. habil. Emil C. Reisinger

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. med. Steffen Mitzner
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abteilung für Nephrologie
Universitätsklinikum Rostock
2. Herr PD Dr. med. habil. Thomas Mencke
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie
Universitätsklinikum Rostock
3. Herr Prof. Dr. med. Augustinus Bader
Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum für Zelltechniken und angewandte
Stammzellbiologie, Universität Leipzig

Datum der Einreichung: 31. Juli 2010

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. Oktober 2011

„Wenn sich der Most auch ganz absurd gebärdet,

Es gibt zuletzt doch noch e' Wein“

(Johann Wolfgang von Goethe: Faust. Der Tragödie zweiter Teil)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Leberversagen	1
1.2 Leberdysfunktion bei Sepsis	3
1.3 Sepsis.....	6
1.4 Biosensoren und Zytotoxizitätstests	11
1.5 Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme und das Immununterstützungssystem EISS	17
2. Zielsetzung	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Sepsis-Diagnostik-Studie	23
3.1.1 Studienpopulation.....	23
3.1.2 Durchführung der Pilotstudie.....	24
3.2 Zellkultur.....	27
3.2.1 Kultivierung und Revitalisierung der HepG2/C3A-Zellen.....	27
3.2.2 Trypanblau-Zellzahlbestimmung.....	28
3.3 Durchführung des Zytotoxizitätstests (Biosensor).....	29
3.3.1 Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450-Isoenzym 1A2.....	29
3.3.2 Messung der Proteinbiosynthese von Mikroalbumin.....	30
3.3.3 Bestimmung von Vitalität und Proliferation	31
3.3.3.1 XTT-Test	31
3.3.3.2 LDH-Freisetzung.....	32
3.3.3.3 Life/Dead-Färbung.....	33
3.4 Statistische Methoden.....	34

4. Ergebnisse	35
4.1 Patientencharakteristika der Sepsis-Diagnostik-Studie.....	35
4.2 Ergebnisse des Zytotoxizitätstests (Biosensor).....	41
4.2.1 Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450-Isoenzym 1A2.....	41
4.2.2 Messung der Proteinbiosynthese von Mikroalbumin.....	44
4.2.3 Bestimmung von Vitalität und Proliferation	46
4.2.3.1 XTT-Test	46
4.2.3.2 LDH-Freisetzung.....	47
4.2.3.3 Life/Dead-Färbung: Bilder	50
4.3 Korrelationen zwischen unterschiedlichen Parametern	54
5. Diskussion	59
6. Zusammenfassung	78
7. Anhang	I
7.1 Allgemein	I
7.1.1 Scores	I
7.1.2 Mikrobiologische Befunde und nachgewiesene Infektions- quellen der ITS-S-Gruppe (n = 10).....	V
7.1.3 Messwerte, Signifikanzen und Korrelationen ausgewählter Parameter	VI
7.2 Abbildungsverzeichnis	XXII
7.3 Tabellenverzeichnis.....	XXIV
7.4 Abkürzungsverzeichnis	XXV
8. Literaturverzeichnis	XXIX
9. Thesen	XLVI
10. Eidesstattliche Erklärung	XLIX

1. Einleitung

1.1 Leberversagen

Das akute Leberversagen (ALV) kann primär als hepatische Erkrankung, jedoch auch sekundär als Folgeerkrankung anderer pathologischer Vorgänge im Körper auftreten. Es ist durch einen Ausfall der Leberfunktion bei Patienten ohne eine bereits bestehende chronische Erkrankung des Organs gekennzeichnet. Die klassische klinische Definition des Leberversagens stützt sich auf die Trias Koagulopathie, Ikterus und hepatische Enzephalopathie (HE). Das Ausmaß der HE bestimmt maßgeblich die Prognose des Patienten [1].

Klinische Untersuchungen und bildgebende Verfahren sind bei kritisch Kranken nicht immer aussagekräftig. Die Diagnose erfolgt aufgrund von statischen, routinemäßig durchgeführten Labortests wie der Bestimmung von Bilirubin, Alanin-Amino-Transferase (ALAT), Aspartat-Amino-Transferase (ASAT) und/oder Albumin und Ammoniak im Serum. Ein klinisch manifester Ikterus deutet auf eine fortgeschrittene Leberdysfunktion hin, wobei der Anstieg des Bilirubins im Serum oft erst langsam erfolgt. Bilirubin-basierte Prognosescores wie der SAPS II- oder der SOFA-Score (siehe Seite 24) erfassen das Leberversagen daher erst 48 bis 72 Stunden nach den anderen Organdysfunktionen [2, 3].

Das Leberversagen ist weder ein seltenes noch ein spätes Organversagen. Wegen schwerer Lebererkrankungen werden jährlich über 70 000 Menschen in Deutschland stationär behandelt. Davon sterben ca. 20 000 Patienten an den Folgen ihres chronischen und akuten Leberversagens. Die Inzidenz des akuten Leberversagens in Deutschland liegt bei etwa 100 bis 150 Fällen pro Jahr [4, 5]. In einer prospektiven Multizenterstudie an kritisch kranken Patienten wurde die frühe Leberdysfunktion als der bedeutsamste mortalitätsrelevante Faktor, selbst nach Korrektur für andere Organversagen, identifiziert. Die Inzidenz einer neu aufgetretenen frühen Leberdysfunktion (Serum-Bilirubin $> 34,2 \mu\text{mol/l}$; 48 Stunden nach Aufnahme) bei Intensivpatienten wird mit knapp 11 % beschrieben [3]. Die Letalität des akuten Leberversagens beträgt in Abhängigkeit von der Ätiologie 20 bis 80 %

[6, 7]. Die extrahepatischen Komplikationen sind die Prognose bestimmenden Faktoren beim akuten Leberversagen [8]. Die Art und die Ausprägung der auftretenden Komplikationen hängen von der Dynamik und der Ätiologie des Leberversagens ab. Hierzu zählen eine Verbrauchskoagulopathie, die schnelle Entwicklung einer sekundären Schädigung extrahepatischer Organe sowie eine Kreislaufinsuffizienz bis hin zum Multiorganversagen. Die verstreichende Zeit zwischen dem Auftreten von Ikterus und HE/Bewusstseinsstörung wird für die prognostisch wichtige Unterscheidung des hyperakuten (Zeitspanne zwischen Ikterus und HE: weniger als 7 Tage), des akuten (Zeitspanne zwischen Ikterus und HE: 7 bis 28 Tage) und des subakuten (Zeitspanne zwischen Ikterus und HE: mehr als 28 Tage) Leberversagens herangezogen (siehe Abbildung 1) [9].

Generell gilt, dass der rasch progrediente Verlauf mit kurzem Zeitintervall zwischen Ikterus und einer HE mit einer relativ besseren Prognose einhergeht [1, 10].

Für ein primäres Leberversagen gibt es vielfältige Ursachen. So sind infektiöse Prozesse (z. B. Virushepatitiden), metabolische Erkrankungen (Morbus Wilson), toxische Mechanismen (Paracetamol, Knollenblätterpilzgifte) sowie schwangerschaftsassozierte Komplikationen (akute Schwangerschaftsfettleber, HELLP-Syndrom [Haemolysis, Elevated Liver Enzyme Levels, Low Platelet Count]) als Auslöser bekannt [6].

Von einem akut-auf-chronischen Leberversagen (ACLV) spricht man bei der akuten Exazerbation einer bereits bestehenden Lebererkrankung und wurde so erstmals von Jalan et al. 2002 definiert [11]. Zu den häufigsten präzipitierenden Ereignissen gehören die Infektionen (z. B. Pneumonie, spontanbakterielle Peritonitis, Harnwegsinfekt), schwere gastrointestinale Blutungen (z. B. Ösophagusvarizenblutung) sowie die Exazerbation der Grundkrankheit (z. B. alkoholische Hepatitis oder akuter Schub einer chronischen Hepatitis B). Die 30-Tage-Letalität von Patienten mit einem ACLV ist hoch und wird mit 50 bis zu 66 % beschrieben [12, 13]. Beide Varianten (ALV und ACLV) sind prinzipiell reversibel, sofern die Phase der akuten Dekompensation überwunden werden kann. Die relativ hohe Letalität des Leberversagens verglichen mit dem Versagen anderer Organe ist nicht zuletzt durch die eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten bedingt. Bei nicht ausreichender Eigenregeneration der Leber kommt nur eine Lebertrans-

plantation als therapeutische Option in Betracht. Die Unterscheidung zwischen akutem, subakutem und akut-auf-chronischem Leberversagen ist schematisch in der Abbildung 1 dargestellt:

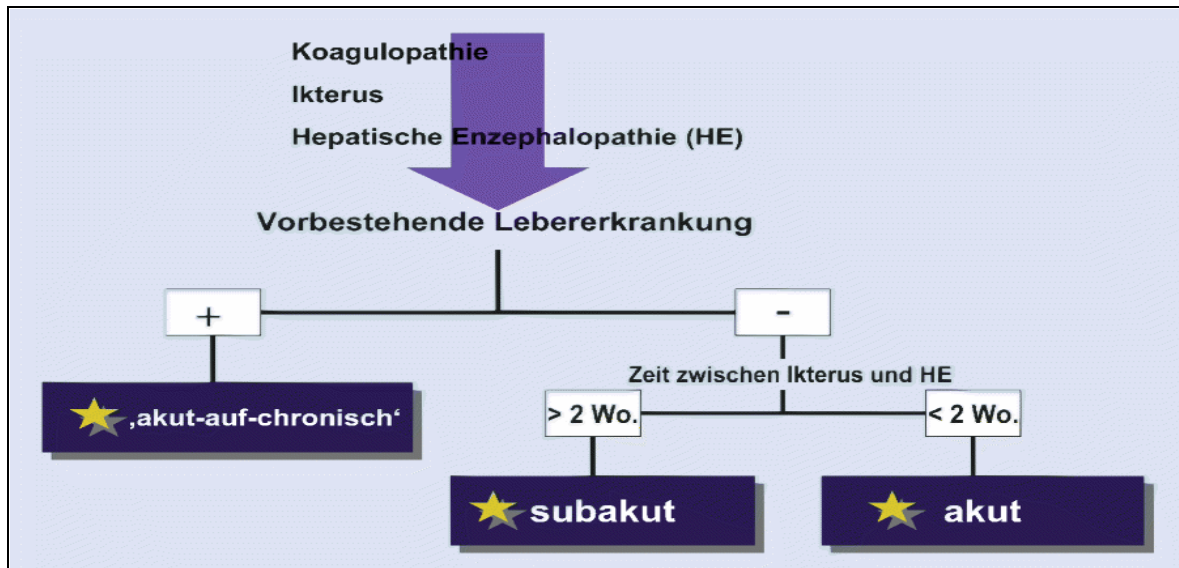


Abbildung 1: Einteilung des Leberversagens; in Anlehnung an Bauer et al. [10]

Neben den oben genannten Gründen für ein primäres Leberversagen kommt es auch im Rahmen von Systemerkrankungen wie Sepsis, SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), bei Pankreatitis, Herz- und/oder Lungenversagen zu einem Leberversagen, welches als sekundäres Leberversagen bezeichnet wird und die Prognose der Patienten entscheidend verschlechtert [14, 15].

1.2 Leberdysfunktion bei Sepsis

Die zentrale Rolle im Stoffwechsel und der Immunfunktion macht die Leber zum Zielorgan und gleichzeitig zum Promoter einer systemischen Entzündungsreaktion und des Multiorganversagens. Aufgrund der speziellen Abflussverhältnisse des portalvenösen Blutes wird die hepatische Zirkulation oft als Einheit mit der des Gastrointestinaltraktes gesehen [16].

Bisherige Erklärungsmodelle sehen die Ursache einer Leberdysfunktion im Rahmen septischer Krankheitsbilder in Perfusionsstörungen im Splanchnikusgebiet mit konsekutiven Veränderungen der hepatischen Makro- und der Mikrozirkulation.

Weitere Schäden werden direkt durch Endotheldysfunktion sowie mittels direkter Schädigung durch bakterielle oder andere (endo- und exogene) Toxine verursacht [17]. Im hyperdynamen Zustand des septischen Geschehens führt die Zunahme des Herzzeitvolumens auch zu einer Steigerung der Leberdurchblutung, der Blutfluss zu Darm und Leber steigt proportional an [18]. Allerdings besteht auch ein deutlich erhöhter Bedarf an Sauerstoff im Hepatosplanchnikusgebiet, was schon in der frühen Phase der Sepsis eine funktionelle Hypoperfusion mit Minderversorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zur Folge hat. Hiervon betroffen sind vor allem die zentrolobulären Bereiche der Leber, die schon unter physiologischen Bedingungen nur grenzwertig oxygeniert bzw. mit Nährstoffen versorgt werden. Je nach Ausmaß der Zellhypoxie kommt es zu reversiblen Funktionsstörungen bis hin zum Zelluntergang [19, 20]. Endotoxine, die über die Pfortader die Leber erreichen, werden hier unter physiologischen Bedingungen von den immunkompetenten Kupffer-Zellen neutralisiert. Im Verlauf einer Sepsis kommt es aufgrund einer gestörten Permeabilität der Darmmukosa für Makromoleküle zur Migration und Einschwemmung (Translokation) von Bakterien und Endotoxinen über das portalvenöse System. Dies führt unter gestörter hepatischer Mikrozirkulation bei erhöhter Belastung durch Endotoxine zur Dysfunktion von Hepatozyten und Aktivierung der Kupffer-Zellen. Folge dieser Aktivierung ist die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zelltoxischen Sauerstoffradikalen, die mitochondriale und zelluläre Membranen angreifen [21]. Eine Zytokinausschüttung (z. B. Tumor Nekrose Faktor-alpha [TNF- α], Interleukine [IL] 1, 6 und 12, Plättchenaktivierender Faktor [PAF]) führt neben der Perfusionsstörung zur weiteren direkten und indirekten Schädigung der Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen. Die zelluläre Proteinbildung wird gestört, Zellorganellen zerfallen und lysosomale Enzyme werden in der Zelle freigesetzt. Dies führt zu einer weiteren gesteigerten Aktivierung des Immunsystems und einer fortschreitenden Zerstörung der Zellstruktur.

TNF- α gilt als einer der Hauptmediatoren der Sepsis. Es induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. P-Selektin) auf Gefäßendothelien sowie die Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren wie proinflammatorisches IL-1 β , IL-6, IL-8, Interferon- γ oder antiinflammatorisches Prostaglandin-E₂ als auch die Induktion der hepatischen Bildung von Akute-Phase-Proteinen (APP). Es verstärkt mittelbar die chemotaktische Aktivität von Monozyten, Leukozyten, vornehmlich polymorph-

kernige neutrophile Granulozyten und Lymphozyten [22]. Diese Leukozyten binden an die Endothelzellen und sammeln sich in den Lebersinusoiden an, wodurch die hepatische Mikrozirkulation gestört wird. Dies wird durch eine gleichzeitig stattfindende Thrombozytenadhäsion verstärkt [23, 24]. Die Leukozyten setzen zusätzlich toxische Metabolite wie Sauerstoffradikale frei und tragen dadurch zur weiteren Schädigung des Organs bei.

Im Rahmen einer Sepsis ist besonders die exkretorische Funktion der Leber beeinträchtigt. Der Grund dafür ist eine verminderte Expression vor allem von kanalikulären Transportproteinen. Die Sekretion von Bilirubin und Gallensäuren in die hepatischen Kanälchen erfolgt über aktive Transportmechanismen. Sepsis und Infektion führen durch die hohen lokalen Konzentrationen lokal freigesetzter inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 zur Hemmung der Expression dieser Transporter. Daher sind Sepsis und Cholestase, die zur Ausbildung aufsteigender Infektionen im Bereich der Gallenwege führen kann, eng verbunden [25]. Laschke et al. zeigten 2006 in einer Studie an Mäusen, dass die septische Cholestase eher durch die P-Selektin-vermittelte leukozytäre Infiltration der Leber als durch die direkte Wirkung lokal produzierter und freigesetzter proinflammatorischer Mediatoren verursacht wird [26]. Letztendlich führt das verminderte Gallensäureangebot im Darm zu einer weiteren Verschlechterung der Darmintegrität. Folge ist der zunehmende Einstrom von Bakterien und Toxinen über das Pfortadersystem in die Leber mit konsekutiver Zytokinfreisetzung, welche den septischen Prozess nicht nur weiter unterhält, sondern den Übergang in ein Multiorganversagen forciert.

Während früher die Bedeutung einer Leberinsuffizienz im Rahmen der Sepsis unklar war, herrscht heute die Meinung vor, dass diese Veränderungen von größter prognostischer Relevanz sind. Durch Messung der Plasmaverschwinderate (Plasma Disappearance Rate = PDR; in %/min) von intravenös appliziertem Indozyaningrün (Indocyanine Green = ICG) als frühem Marker einer Leberdysfunktion konnte gezeigt werden [27], dass die Schwere der Leberdysfunktion im Rahmen einer schweren Sepsis und eines Multiorganversagens von relevanter Bedeutung und entscheidend mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert ist [14, 15]. Bakker et al. geben die Häufigkeit einer Leberfunktions-

störung bei Patienten mit schwerer Sepsis mit 19 bis 22 % an [28]. Wang et al. zeigen, dass die Leberfunktion bereits sehr früh nach Einsetzen der Sepsis eingeschränkt ist [29].

1.3 Sepsis

Die allgemein geltende Definition der Sepsis wurde 1992 vom American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine im Rahmen einer Konsensus-Konferenz festgelegt und ist in Tabelle 1 dargestellt [30]. Es werden demnach unterschieden: SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock. Sind die Bedingungen einer massiven Gewebsschädigung erfüllt, kann das klinische Bild einer Sepsis auch ohne zugrunde liegende Infektion auftreten. Diese wird als SIRS im Sinne einer hyperinflammatorischen Reaktion des Wirts auf verschiedene Ursachen (z. B. Trauma, Operation, Verbrennung oder Pankreatitis) bezeichnet.

Als Sepsis gilt ein SIRS, welches durch eine Infektion ausgelöst wird. Dabei ist nicht zwingend der Erreger im Sinne einer Bakteriämie nachweisbar, sondern deren Endo- bzw. Exotoxine (z. B. Lipopolysaccharide von gram-negativen oder Superantigene von gram-positiven Erregern) mit systemischer Folge für den Wirt.

Tabelle 1: Definitionen der systemischen Infektionen

Klinische Entität	Diagnosekriterien der Konsensus-Konferenz von 1992
SIRS	Systemische entzündliche Reaktion, wobei mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein müssen: 1. Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C 2. Herzfrequenz > 90/min 3. Atemfrequenz > 20 /min oder P _a CO ₂ < 32 mmHg 4. Leukozyten > 12000/μl oder < 4000/μl, oder > 10 % unreife Formen (Linksverschiebung)
Sepsis	SIRS plus klinische Zeichen und/oder Nachweis einer Infektion (positiver mikrobiologischer Befund)
Schwere Sepsis	Sepsis mit Zeichen einer Organdysfunktion, einer gestörten Organperfusion oder der Hypotonie
Septischer Schock	Schwere Sepsis mit persistierender Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution

Die Kriterien einer Organdysfunktion bei schwerer Sepsis bzw. septischem Schock nach der PROWESS-Studie (Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) sind in Tabelle 2 zusammengefasst [31].

Tabelle 2: Definitionen für die akute Dysfunktion einzelner Organsysteme nach Kriterien der PROWESS-Studie

Organsystem	Aufnahmekriterien
Kardiovaskuläre Dysfunktion	Arterieller systolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg oder ein MAP ≤ 70 mmHg für ≥ 1 h trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr und adäquatem intravaskulärem Volumenstatus und/oder die Notwendigkeit der Gabe von Vasopressoren, um einen systolischen Blutdruck von ≥ 90 mmHg oder einen MAP ≥ 70 mmHg zu erreichen
Renale Dysfunktion	Urinausscheidung von $\leq 0,5$ ml/kg/h für ≥ 1 h trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr
Respiratorische Dysfunktion	$P_aO_2/FiO_2 \leq 250$ Falls die Lunge das einzige Organ ist, das die Kriterien für ein Organversagen erfüllt und gleichzeitig der vermutete Infektionsort ist, muss der $P_aO_2/FiO_2 \leq 200$ sein Die Messwerte müssen auf arteriellen Blutgaswerten basieren
Metabolische Dysfunktion	a) pH $< 7,3$ oder Basendefizit $\geq 5,0$ mmol/l b) Plasma-Laktatkonzentration $> 1,5$ -mal höher als der obere Grenzwert der Normwerte
Hämatologische Dysfunktion	Thrombozyten $< 80\ 000/mm^3$ oder ein 50%iger Abfall der Thrombozyten gegenüber dem höchsten Wert der letzten drei Tage

Die Kriterien der Leberdysfunktion bzw. des Leberversagens werden in der PROWESS-Studie nicht berücksichtigt. Eine in Studien gebräuchliche Definition der hepatischen Dysfunktion fordert eine erhöhte Bilirubinkonzentration im Plasma ($> 34,2$ $\mu\text{mol/l}$) und eine Erhöhung der Leberenzymplasmakonzentrationen. Von einem Leberversagen wird ausgegangen, wenn die Bilirubinplasmakonzentration > 86 $\mu\text{mol/l}$ bei gleichzeitig stärkerer Erhöhung der Leberenzyme im Plasma festzustellen ist [3, 32, 33].

Die oben genannten Sepsiskriterien wurden im Jahre 2001 durch die so genannte PIRO-Klassifikation erweitert, um Subgruppen von Sepsiskranken genauer identifizieren zu können [34]. Der entscheidende Fortschritt dieses Systems besteht darin, dass die Wichtigkeit erkannt wurde, die Prädisposition (**P**redisposition) des Patienten, das schädigende Ereignis (**I**nsolet/Infection), die Antwort des Körpers

darauf (**R**esponse) sowie den Schweregrad der Organdysfunktion (**O**rgandysfunction) zu erfassen, um so das Ausmaß der Sepsis einordnen zu können. Damit kann gegenwärtig das PIRO-System am umfassendsten zur Charakterisierung und Abschätzung der Schwere einer Sepsis beitragen.

Die Sepsis wird heutzutage als eine dysregulierte Entzündungsreaktion sowohl durch die Aktivierung immunkompetenter Zellen (wie neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen) als auch durch die der humoralen Abwehrmechanismen des Körpers verstanden. Diese beinhalten verschiedene Plasmaproteinkaskaden, z. B. das Komplement-, das Gerinnungs- und Fibrinolyse-, das Kallikrein-Kinin- sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System [35]. Häufig steht am Beginn der Sepsis eine Hyperinflammation im Vordergrund (siehe Abbildung 2). Die Antwort des Körpers auf eine systemische Invasion von Mikroorganismen oder eine systemische Einschwemmung von Endo- bzw. Exotoxinen löst eine Signaltransduktion sowie Zellaktivierung und die überschießende Freisetzung von Mediatoren aus, welche die Entzündungsreaktion unterhält und verstärkt. In der Entwicklung des septischen Prozesses gerät das inflammatorische System in einen hyperaktiven Zustand [36], der zu einer überschießenden Ausprägung der normalen entzündlichen Immunantwort führt. Der Verlauf bzw. die Interaktion dieser sich selbst verstärkenden Mediatorenkaskade kann über einen protrahiert vorhandenen Schockzustand mit konsekutiver Ischämie und Dysfunktion einzelner Organsysteme zum Multiorganversagen mit hoher Letalität führen [37, 38, 39], wobei mit jedem zusätzlichen Organversagen das durchschnittliche Letalitätsrisiko der Sepsispatienten um 15 bis 20 % ansteigt [40]. Die klinisch darstellbaren Organversagen sind somit als Resultat einer sehr komplexen Homöostasestörung nahezu aller Regelkreise und Kaskadensysteme des menschlichen Organismus zu sehen, wobei den Zytokinen im Sinne der Fehl- oder Überaktivierung von Zellen sowohl der unspezifischen als auch der spezifischen Immunantwort eine entscheidende Rolle zukommt. Das komplexe Zusammenspiel der Zytokine und sekundärer Mediatoren wie z. B. Stickstoffmonoxid, Prostaglandine, Adhäsionsmoleküle und die entstehenden Sauerstoffradikale führen zu verschiedenen pathophysiologischen Veränderungen. Die Folgen sind eine Gerinnungsaktivierung und Mikrozirkulationsstörungen aufgrund von Mikrothromben, eine Zunahme der Gefäßpermeabilität mit Kapillarlecksyndrom

und konsekutiver interstitieller Ödembildung sowie ein Tonusverlust der Arteriolen mit Abnahme des Perfusionsdrucks und arterieller Hypotension. Zunehmendes Kreislaufversagen führt zu inadäquater Sauerstoffversorgung der Gewebe. Organminderperfusion und Zellhypoxie haben eine diffuse Gewebeschädigung zur Folge und führen unbehandelt über Organ- bzw. Multiorgandysfunktion zum Tod des Patienten durch Multiorganversagen.

Begleitet wird dieses Syndrom von einer Gegenregulation, die eine überschießende Entzündung verhindern soll, dem Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome (CARS; siehe Abbildung 2). Diese Gegenregulation dient physiologischerweise dazu, einer in Gang gesetzten Entzündungskaskade entgegenzuwirken und den Organismus somit vor übermäßiger, unkontrollierter Inflammation zu schützen.

Die Immunantwort des Organismus auf eine schwere Infektion wird somit als ein zweiphasiges Konzept verstanden: einer initialen systemischen Inflammation (SIRS), die mit einer systemischen Antiinflammation (CARS) einhergeht, wobei beide Phänomene überlappend vorliegen. Mit zunehmender Zeit dominiert dann das CARS. Bone nennt dieses Nebeneinander von systemischer Inflammation und Antiinflammation „Mixed Antagonistic Response Syndrome“ (MARS) [41, 42, 43, 44].

Im schwersten Fall kann dies zum kompletten Zusammenbruch des Immunsystems führen, ein Zustand, den Volk et al. als Immunparalyse bezeichnen [45]. Das körpereigene Immunsystem hat die Aufgabe, eine Invasion der Mikroorganismen zu verhindern. Eine fehlende Immunantwort begünstigt ein unkontrolliertes Keimwachstum und die Ausbreitung der Infektion. Umgekehrt kann die eigene überschießende fehlregulierte Entzündungsantwort bzw. Immunreaktion, wie sie bei der Sepsis beobachtet wird, ebenfalls die Prognose des Patienten verschlechtern [46].

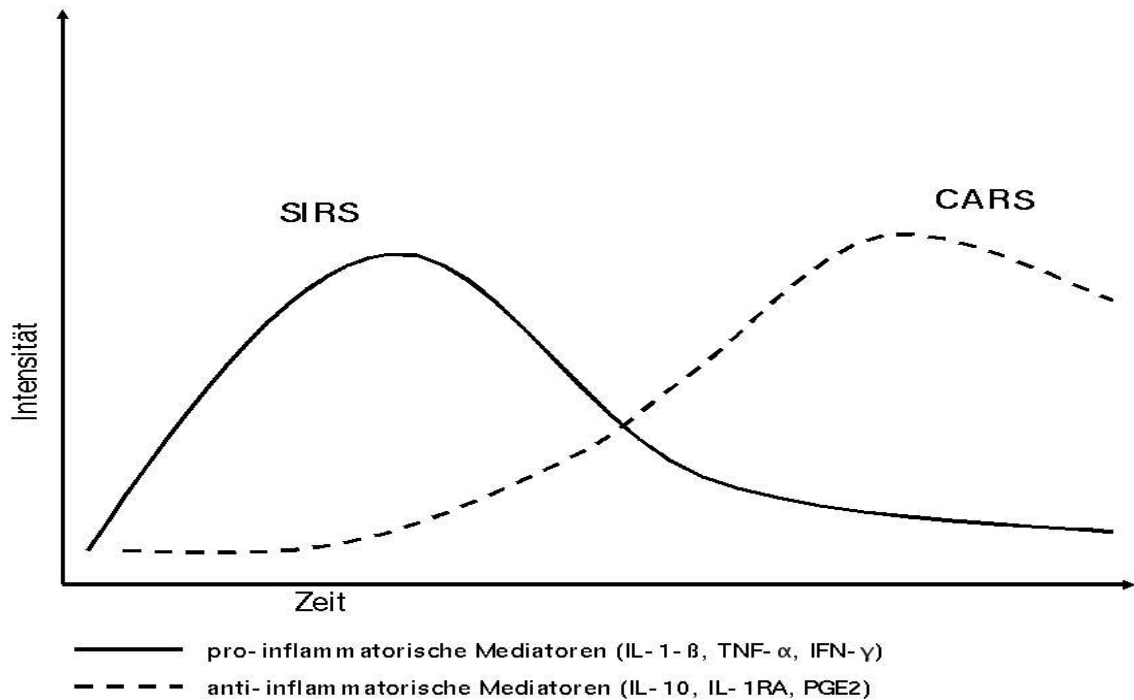


Abbildung 2: Bipolare Störung des unspezifischen Immunsystems bei Sepsis; in Anlehnung an Höflich und Volk [47]

Die schwere Sepsis ist die Haupttodesursache auf nichtkardiologischen Intensivstationen. Daten aus den USA belegen, dass dort jährlich ca. 751 000 Sepsisfälle auftreten und pro Jahr etwa 215 000 Patienten an den Folgen einer Sepsis versterben, was einer Letalität von ca. 28,6 % entspricht [48]. Im Falle des septischen Schocks steigt die Letalität auf über 60 % an [49].

In Deutschland erkranken pro Jahr 79 000 Einwohner (das entspricht 0,116 % der Bevölkerung) an einer Sepsis und ca. 75 000 Einwohner (= 0,11 % der Bevölkerung) an einer schweren Sepsis bzw. an einem septischen Schock mit einer Letalität von ca. 55 %. Mit bis zu 57 000 Patienten, die (bei steigender Inzidenz) an septischen Erkrankungen in Deutschland versterben, stellen diese die dritthäufigste Todesursache nach der koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt, aber noch vor der Herzinsuffizienz, dar [50]. Unter volkswirtschaftlicher Betrachtung nimmt die Therapie der schweren Sepsis ebenfalls eine herausragende Stellung ein. Schmid et al. zeigten in einer retrospektiven Analyse aus den Jahren 1997 bis 2000, dass die anfallenden direkten und indirekten Kosten, die durch Sepsiserkrankungen hervorgerufen werden, in Deutschland im Gesamten jährlich zwischen 3,6 und 7,9 Mrd. Euro liegen. Etwa 30 % des Budgets für die intensiv-

medizinische Betreuung müssen für die Behandlung der schweren Sepsis aufgebracht werden [51].

1.4 Biosensoren und Zytotoxizitätstests

Biosensoren sind miniaturisierte Messfühler, bei denen die Erkennungskomponente auf einem biochemischen Mechanismus beruht [52, 53]. Sie werden zur selektiven Bestimmung einer chemischen Verbindung in einem komplexen Gemisch eingesetzt. Sie verbinden die Selektivität von biologischen Prozessen mit modernen analytischen Detektionsmöglichkeiten, wobei die Biokomponente die Selektivität und Empfindlichkeit des Sensors bestimmt.

Das erste Messsystem, das als analytischer Biosensor bezeichnet werden kann, wurde 1962 von Clark und Lyons entwickelt. Dieses System ermöglicht die Bestimmung von Glucose im Blut während und nach Operationen [54].

Durch Fortschritte in Biotechnologie und Mikroelektronik sind seither viele weitere Biosensoren zu unterschiedlichen Zwecken entwickelt worden. Als Anwendungsbereiche sind die toxikologisch-pharmazeutische und biotechnologische Industrie, die Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie der klinisch-medizinische Bereich zu nennen. Durch die Entwicklung von so genannten Biosensor-Chips wurde die Effizienz in diesen Bereichen beträchtlich erhöht. Diese Biochips sind sehr kleine Probenträger aus biokompatiblen Glas, Kunststoff oder Silizium, die mit einer Biokomponente beschickt werden und so als Biosensor fungieren. So können als Biokomponente beispielsweise DNA-Sonden fixiert werden. DNA-Chips bestehen aus einem festen Träger, auf dem in einem regelmäßigen Muster einzelsträngige DNA-Moleküle bekannter Sequenz aufgebracht sind. Bei höchstintegrierten DNA-Chips können mehr als 10 000 verschiedene Gene gleichzeitig analysiert werden. Mit Hilfe neuer elektrischer Biochip-Systeme ist es möglich, verschiedene Biomoleküle wie Nukleinsäuren, Proteine oder Antikörper flexibel und innerhalb eines kurzen Zeitraums zu detektieren [55]. Im Unterschied zum DNA-Chip enthält der elektrische Bio-Chip nur wenige Markergene. Ein Analysegerät misst elektrische Signale, die auf dem beschickten Chip erzeugt werden und in Zukunft ein direktes Monitoring des physiologischen Zustandes von Produktionszellen in einem Bio-

prozess realisieren könnten [56, 57]. Aber auch Zellen bzw. Zellverbände lassen sich auf der Chipoberfläche auftragen und so als Messfühler verwenden. Die Rostocker Firma Bionas GmbH verbindet humane Zellkultursysteme mit Siliziumchips und setzt dieses kombinierte System zu pharmakodynamischen, zytotoxischen und/oder metabolischen Untersuchungen ein [58]. Die Technologie ist bei vielen verschiedenen Zelltypen und Zelllinien einschließlich Primärzellkulturen anwendbar.

Trotz dieser Entwicklung sind konventionelle Zellkultursysteme als komplexe Biosensorsysteme unverzichtbar, um selbst bei genauer Kenntnis der chemischen Zusammensetzung eines Mediums seine biologische Wirkung beurteilen zu können. Die Entwicklung solcher Biosensoren zielt also darauf, nicht nur die Zusammensetzung komplexer Gemische bestimmen zu können, sondern vor allem auch ihre biologische oder medizinische Bedeutung zu erfassen. Die Zelle selbst wird somit Bestandteil des Mess- und Sensorsystems und gibt Auskunft über bestimmte Wirkstoffe oder Gifte, die auf sie einwirken. Die Schweriner Firma Primacyt Cell Culture Technology GmbH hat ein Langzeit-Kultursystem für primäre humane Hepatozyten entwickelt [59], das als Biosensor mit einem hohen Differenzierungsgrad der Zellen und der damit verbundenen langfristigen Aufrechterhaltung hepatozellulärer Funktionen zur Prüfung von Medikamenten und Umweltstoffen auf mögliche hepatotoxische Effekte und zu Metabolismusanalysen eingesetzt werden kann. Mit diesen Leberzellen kann die Wirkung eines Medikaments, eines Nahrungsmittelzusatzes oder eines anderen Fremdstoffes getestet werden [60, 61].

Im Folgenden werden drei komplexe auf Zellen basierende Biosensorsysteme vorgestellt, die im Rahmen von Inflammation und Organversagen zur Analyse von Zell- bzw. Organfunktion und Regeneration entwickelt wurden.

Die Entwicklung dieser zellbasierten Biosensorsysteme dient der Etablierung neuer Parameter zur Frühdiagnose von Organdysfunktionen und Organversagen. Sie sollen einen Behandlungsverlauf überprüfen und eventuell prognostische Wertigkeit besitzen und der Aufdeckung endogener und exogener Toxinen dienen. Dazu werden Plasma- bzw. Serumproben gezielt auf Zell- und Gewebemodelle gegeben, die bestimmte Organsysteme repräsentieren.

a) Neuro-Biosensor (Chip-Sensor):

Schon seit langem werden Mikroelektroden-Arrays für die Untersuchung neuronaler Netzwerke eingesetzt, da sie sich hier als sehr geeignete Systeme erwiesen haben [62, 63]. Diese Arrays überwachen die spontane oder stimulierte elektrische Aktivität erregbarer Zellen. Sie ermöglichen die Beschreibung von Wirkungen neuroaktiver Substanzen und erlauben durch eine funktionelle Online-Analyse die Reaktion lebender Zellen auf externe Noxen [64]. Zur extrakorporalen qualitativen und/oder quantitativen Erfassung neurotoxischer Substanzen im Blutplasma werden auf einem Mikroelektroden-Array basierende Biosensoren als Neurochip eingesetzt. Als Biokomponente dient ein Gemisch aus fetalen Maus- bzw. Rattenhirnnerven- und Gliazellen in Kultur (Stütz- und Stoffwechselfunktionen), welche sich an der Sensor-Zellkulturoberfläche anheften. Aus den Nervenzellen wachsen Fortsätze aus, die untereinander ein neuronales Netzwerk in engem Kontakt mit den Gliazellen bilden [65]. Dieses entwickelt im Verlauf ein spontanes elektrisches Aktivitätsmuster, welches gewebetypisch ist und durch die Kopplung der Zellen an die Sensoren gemessen werden kann. Insbesondere beim Vorliegen von enzephalopathischen Zuständen wie im Leberversagen oder bei Komazuständen anderer Ursache sollen so zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse geliefert werden. Hier zeigte sich eine reproduzierbare Korrelation von der Stärke der Neuronenerregung zur Schwere der metabolischen Enzephalopathie [66].

b) Leukozyten-Biosensor (Zell-Sensor):

Im Verlauf eines SIRS oder einer Sepsis wird auf der zellulären Ebene des Immunsystems den Monozyten und neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle beigemessen [67]. Die Zellen dienen sowohl in der Initialphase der Antigen-Präsentation als auch im Verlauf zur Stimulation von leukozytärer Zytokin- bzw. Chemokinausschüttung. Auch sind sie auch zur Phagozytose fester Partikel (Mikroorganismen, Zelltrümmer, Fremdkörper) sowie zur Bildung freier Radikale befähigt. Hierbei handelt sich um sehr reaktive, instabile zytotoxische Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen (Superoxide, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale), die als Reactive Oxygen Intermediates (ROI) bezeichnet werden [68]. Grundlage des Leukozyten-Biosensors ist, dass Zelllinien nach geeigneten Differenzierungsschritten und Applikation von Probenmaterial zur

Produktion von ROI angeregt werden. Bei den in ein Kulturmedium eingesetzten Leukozyten handelt es sich um eine permanente Zelllinie. Als Sensorzelle werden menschliche promyelozytische HL-60-Zellen verwendet [69, 70]. Nach vorheriger Induktionsbehandlung in granulo- oder monozytäre Zellen differenzieren sie und werden nach Zugabe von Humanserum zur Produktion von ROI angeregt. Die so gebildeten Produkte reagieren über eine Chemoluminiszenz- oder Fluoreszenzreaktion.

Die untersuchten Proben weisen unterschiedliche Werte bei den Seren von Patienten mit SIRS oder Sepsis zu denen mit schwerer Sepsis und septischem Schock sowie im Vergleich zu gesunden Probanden auf. Daneben lässt sich eine Differenzierbarkeit zwischen dem septischen Krankheitsbild von Patienten mit hoher Überlebenserwartung und solchen mit einem demgegenüber hohen Letalitätsrisiko erkennen. Mit zunehmender Schwere des Krankheitsverlaufes sinken die durch die Serumprobe verursachte gemessene Reaktion und die damit gebildeten Sauerstoffintermediate unter den Normbereich, den man bei gesunden Probanden ermittelt.

Die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit des patentierten Tests wird erst durch die Verwendung von standardisierten und reproduzierbaren Zellsystemen als Biosensoren möglich [71] (bisher unveröffentlichte Resultate).

c) Leberzellfunktions-Biosensor (Zell-Sensor):

Der Einsatz von In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Verträglichkeit und Bio-transformation neuer Wirkstoffe stellt eine gängige Methode in den Bereichen der Pharmakologie, Toxikologie und Biomedizin dar. Hierbei können grundsätzlich alle Zellfunktionen und Zellstrukturen Angriffspunkt für toxische Substanzen sein. Den größten Teil unter den In-vitro-Methoden nehmen die Zellkulturen ein. Grundsätzlich stehen Zelllinien tierischen oder menschlichen Ursprungs zur Verfügung.

Da die Leber den Großteil des Fremdstoffmetabolismus im Organismus übernimmt, sind humane Hepatozytenpräparationen am besten für komplexe prädiktive Metabolismusuntersuchungen über die Lebertoxizität von Substanzen beim Menschen geeignet, da andere Spenderspezies teilweise eine unterschiedliche Enzymausstattung mit diskrepanten Stoffwechselwegen aufweisen und gewonnene

Ergebnisse nicht immer auf den Menschen übertragbar sind [72, 73, 74]. Primäre Hepatozyten sind in diesem Zusammenhang geeignet, die normale Physiologie einer Leberzelle zu repräsentieren und können in dieser Form In-vitro differenzierte leberspezifische Funktionen wie den Phase-I- und Phase-II-Metabolismus und die Proteinbiosynthese für mehrere Tage aufrechterhalten [75, 76].

Zur Herstellung von Primärkulturen ist eine Isolation der Zellen aus dem Spenderorganismus notwendig. Werden humane Hepatozyten verwendet, stellt sich das Problem der begrenzten Verfügbarkeit entsprechender Spender. Außerdem ist der technische Aufwand der Aufbereitung groß. Trotz dieser Nachteile besteht weiterhin ein starkes Interesse an der Verwendung primärer humaner Hepatozyten. So wurde von der Firma Primacyt aus Schwerin (siehe oben) ein standardisiertes und validiertes Langzeit-Kultursystem für humane Hepatozyten entwickelt [61].

Im Gegensatz dazu können transformierte Zelllinien In-vitro unbegrenzt durch Passagieren vermehrt werden, wodurch das Problem der limitierten Verfügbarkeit primärer humaner Hepatozyten umgangen werden kann. Bei der gut differenzierten Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 sind die wesentlichen Funktionen normalen Lebergewebes enthalten [77]. Diese Zelllinie ist in der Lage, Albumin, Harnstoff und α -Fetoprotein zu synthetisieren und besitzt Fremdstoff-metabolisierende Enzyme in aktiver und induzierbarer Form [78, 79]. Im Vergleich zu primären Hepatozyten ist allerdings sowohl die enzymatische Aktivität als auch die Harnstoffsynthese oder Cytochrom P450-Aktivität (CYP) deutlich niedriger [80, 81]. Bei In-vitro-Metabolisierungstests erfolgt die Bestimmung der durch die Hepatozyten verstoffwechselten Substanzen über den direkten laborchemischen Nachweis. Eine vorhandene Toxizität von Substraten bzw. Produkten auf die Hepatozyten selbst wird durch Funktions- und Vitalitätstests für die verwendeten Hepatozyten geschlossen.

Dehn et al. weisen HepG2-Zellen als sinnvoll nutzbare Indikatoren für die toxische In-vitro-Wirkung von Cadmium auf Zellen aus, indem die Aufnahme und Verteilung von Cadmium in der Leberzelle untersucht wurde [82]. Zytotoxische Effekte wurden bezüglich Vitalität durch Vitalfärbung (Neutralrot und Tetrazolium-Bromid), durch den Live/Dead-Test und durch die Messung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt. Als Hepatozyten-Funktionstests wurden die Entgiftungskapazität

mittels Glutathiongehalt (Antioxidans), die Induktion von Metallothioneinen (schwermetallbindende Proteine) sowie die Aktivität von CYP 1A1/1A2 (durch den Ethoxyresorufin O-Deethylase-Test [EROD]) herangezogen.

Die patentierte Hepatoblastom-Zelllinie HepG2/C3A stellt die Nachfolgelinie von HepG2-Zellen dar. Sussman et al. nutzen diese Zelllinie in einem hybriden Leberunterstützungssystem. Der Vorteil liegt in der In-vitro-Proliferation und der guten Kultivierbarkeit im Dialysator sowie in der Fähigkeit, in glucosedefizientem Medium zu wachsen. Die Autoren weisen auf eine physiologische metabolische Aktivität und ein kontaktinhibiertes Wachstum über einen Zeitraum von mehreren Wochen hin [83]. Basierend auf den Erfahrungen mit dieser Hepatoblastomlinie entwickelten Sauer und Mitarbeiter einen Biosensor, der als Leberzellfunktionstest national und international patentiert wurde [84]. Bei einer bestehenden eingeschränkten bzw. gestörten Leberfunktion auf dem Boden eines direkten Leberschadens oder im Rahmen systemischer Krankheitsbilder (SIRS, schwere Sepsis, septischer Schock) soll so eine endogene und/oder exogene zelltoxische Potenz des Probandenplasmas auf zellulärer Ebene erfasst werden. Bei der Testung auf Zytotoxizität mit einem zellbasierten Biosensor wird generell davon ausgegangen, dass jede Substanz, in Abhängigkeit ihrer Konzentration und Kombination mit anderen Substanzen, toxische Einflüsse auf menschliche Hepatozyten mit konsekutiver Störung der zellulären Funktionen haben kann. Andererseits werden die klinischen Syndrome des Leberversagens im Allgemeinen auf die Akkumulation von toxischen Substanzen und/oder Stoffwechselmetaboliten zurückgeführt, welche von der geschädigten Leber nicht mehr abgebaut werden können.

Der zellbasierte Biosensor besteht aus zwei Komponenten. Zum einen umfasst der Biosensor die mit Hepatozyten der humanen Leberzelllinie HepG2/C3A kultivierten Mikroplatten, der zweite Teil besteht aus den notwendigen gebrauchsfertigen Lösungen bzw. Reagenzien für den Test. Zur Ermittlung der Zytotoxizität kommen in dem vorgestellten Biosensor folgende gebräuchliche Methoden zum Einsatz, die sich in die Aktivitätsbestimmung eines CYP-Isoenzym, der Syntheseleistung und in die Parameter der Vitalität und Proliferation unterteilen lassen:

- Zur Bestimmung der Aktivität von CYP-Isoenzym 1A wird der Ethoxyresorufin-Test (EROD) angewandt und dient als Indikator des Fremdstoffmetabolismus.
- Die Syntheseleistung der eingesetzten Hepatozyten wird durch die Bestimmung von Mikroalbumin abgeleitet.
- Mithilfe der Trypanblau-Färbung wird die Zellzahl und die Vitalität (vitale/avitale Zellen) bestimmt.
- Der XTT-Test misst die intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität und bestimmt die Zellaktivität und Funktionalität.
- Die Messung des LDH-Gehaltes lässt Rückschlüsse auf einen Zelltod oder aber eine starke Zellproliferation zu.
- Der Live/Dead-Test basiert ebenfalls auf der Membranintegrität und färbt die eingesetzten Hepatozyten, so dass visuell vitale und avitale Zellen unterschieden werden können.

Der entwickelte Hepatozyten-Biosensor wird im Rahmen dieser Promotion bei einer Sepsis-Diagnostik-Studie (Pilotstudie) angewandt [168].

1.5 Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme und das Immununterstützungssystem EISS

Organunterstützungssysteme stellen in der Medizin eine etablierte Therapieoption dar. Bei einer terminalen Niereninsuffizienz ist als Nierenersatzverfahren die praktisch zeitlich unbegrenzt mögliche Hämodialyse eine seit langem erfolgreich praktizierte Methode [85].

Eine vergleichbare Dauertherapie der schweren, dekompensierten Leberfunktionsstörung wie das akute oder akut-auf-chronische Leberversagen mit oft tödlichem Ausgang ist derzeit nicht möglich. Zurzeit zielt die Therapie vielmehr auf die Behebung der auslösenden Ursachen des Leberversagens und der sekundären extrahepatischen Komplikationen bzw. Organdysfunktionen. Die Funktionen der Leber sind therapeutisch bezüglich Stoffwechselregulation und Syntheseleistung mittels Substitution zeitweilig konventionell zu beherrschen. Der primäre Ansatzpunkt einer extrakorporalen Leberunterstützungsmaßnahme liegt in der Unter-

stützung der gestörten Entgiftungsfunktion, um für eine gewisse Zeit den Ausfall des Organs zu kompensieren. Bei den artifiziellen Systemen handelt es sich um eine rein maschinelle, zellfreie physikalische Eliminierung toxischer Metabolite bzw. Substanzen durch eine Dialyse mit Membranen und Adsorbentien.

a) Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme:

Demgegenüber arbeiten bioartifizielle Systeme auf der zellunterstützten Basis parenchymatöser Hepatozyten, die im Sinne eines „Bioreaktors“ neben der Detoxifikation auch durch Synthese- und Stoffwechselleistungen die Leberzellfunktion wesentlich umfassender ersetzen sollen. Dabei würde die organunterstützende Therapie auch zu einer Regeneration des Organs beitragen. Nachteilig wirken sich die Probleme in der praktisch-technischen und logistischen Handhabung der Systeme aus. Zu nennen sind hier neben dem Funktionsverlust der eingesetzten Hepatozyten im zeitlichen Verlauf auch die nur kurze Überlebenszeit der Zellen, die Standardisierung der Bioaktivität, die hohen finanziellen Aufwendungen einer Behandlung sowie die grundsätzlich immunogene oder auch kanzerogene Potenz der Fremdleberzellen. Die zur Verwendung kommenden Leberzellkulturen lassen sich in drei Typen unterteilen [86]:

- primäre menschliche oder tierische Hepatozyten,
- gentechnisch veränderte, immortalisierte Hepatozyten,
- Zelllinien aus Hepatomen oder Hepatoblastomen.

Das grundsätzliche Konstruktionsprinzip der verschiedenen, bisher am Patienten getesteten hybriden Leberunterstützungssysteme besteht aus einem extrakorporalen Kreislauf. Das Patientenblut wird entweder direkt oder über einen vorgeschalteten Plasmaseparationsschritt (Filter oder Zentrifuge) dem Bioreaktor zugeführt. Hierbei handelt es sich um einen Hohlfasermembranreaktor, der aus einer Kunststoffkartusche mit eingelassenen Kapillarmembranbündeln besteht. Die eingesetzten Hepatozyten werden auf der Außenseite der Kapillare kultiviert. Diese stellen die Austauschfläche und damit den Interaktionsraum zwischen den eingesetzten Zellen und dem Patientenplasma dar. Unterschiede zwischen den verschiedenen Systemen bestehen besonders hinsichtlich der verwendeten Zellressourcen (Typ und Quelle) und deren eingesetzten Zellmengen. Die klinische

Anwendung bioartifizieller Systeme beschränkt sich derzeit auf die Behandlung akuter oder subakuter Leberversagen mit dem Ziel der temporären Überbrückung. Falls bei dieser Behandlung eine Regeneration des eigenen Organs nicht eintritt, stellt die Lebertransplantation die einzige und endgültige Therapieoption dar. Modelle für bioartifizielle Leberunterstützungssysteme sind zum Beispiel das System BAL (Bioartificial Liver) [87]. Das System besteht aus einem zylinderförmigen Hohlfasermembran-Bioreaktor mit vorgeschalteter Plasma-separation, in dem sich spiralförmig angeordnete Polystyrolfäden als Matrix für adhärenente porkine Hepatozyten befinden. In einer Phase-I-Studie wurden insgesamt zwölf Patienten mit akutem Leberversagen mithilfe von BAL behandelt. Alle Patienten zeigten eine Besserung des neurologischen Status und die Plasmaspiegel für Bilirubin und Ammoniak ließen sich deutlich senken [88].

Ein weiteres Beispiel ist HepatAssist 2000 [89]. Dieses System arbeitet ebenfalls mit immobilisierten primären porkinen Hepatozyten, wobei anfänglich frische, in einem späteren Einsatz am Patienten durch Kryokonservierung einsatzfähig gehaltene Leberzellen vom Schwein eingesetzt werden. Der Stoffaustausch erfolgt nach Passage des Bioreaktors durch Diffusion und hohen Druckgradienten über der Membran (Plasmaseparation und Plasmaadsorption). Mit diesem System konnten zehn Patienten erfolgreich behandelt werden. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung des neurologischen Status. In einer großen multinationalen Studie mit 171 Patienten konnten Überlebensvorteile allerdings nur für Subgruppen gezeigt werden [90].

Die Arbeitsgruppe um Gerlach et al. setzt in ihrem bioartifiziellen Unterstützungssystem menschliche Leberzellen ein. Das MELS-System (Modular Extracorporeal Liver Support System) [91] stellt eine Weiterentwicklung des BELS-Systems (Berlin Extracorporeal Liver Support System) dar, welches mit Schweinehepatozyten betrieben wurde. Die Erkennung der potentiell infektiösen porkinen Retroviren führte schließlich zum Ersatz durch allogene primäre humane Leberzellen. Bei diesem Unterstützungssystem werden der eigentliche Bioreaktor sowie die Albumin-Dialyse und eine konventionelle Hämodiafiltration zwecks direkter Detoxikation des Patientenplasmas in Reihe geschaltet. Der MELS-Bioreaktor besteht aus einem dreidimensionalen unabhängigen Membranbündelgerüst, welches der

Medium- und der Plasmaperfusion sowie einer dezentralen Oxygenierung dient. In einer Phase-I-Studie wurde mit BELS bei acht Patienten mit akutem Leberversagen ein erfolgreiches Überbrücken bis zur Lebertransplantation durchgeführt [92], für eine Behandlung mit dem MELS-System sind ebenfalls nur kleine Fallgruppen publiziert worden [93].

Das hybride Leberunterstützungssystem ELAD (Extracorporeal Liver Assist Devices) basiert im Gegensatz zu den oben beschriebenen Systemen auf der Nutzung eines humanen C3A-Klons der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2, die an der Außenseite einer Hohlfasermembran kultiviert werden [83, 94]. Die zeitgerechte Bereitstellung einer ausreichenden Zellmasse zu Therapiebeginn wird aufgrund der Fähigkeit in-vitro zu proliferieren durch vorherige Anzucht und folgender Kryokonservierung gewährleistet. Der Vorteil der humanen Hepatoblastom-Zelllinie besteht neben der Potenz zur In-vitro-Proliferation darin, dass sie gut im Dialysator kultivierbar sind. Einen Nachteil stellt die Gefahr einer möglichen Metastasierung dar. Die Autoren weisen auf eine physiologische metabolische Aktivität und ein kontaktinhibiertes Wachstum der Zelllinie hin. Vollblut wird durch den Kapillarahohlfaser-Dialysator perfundiert und fließt nach einmaliger Passage durch den mit humanen Leberzellen bestückten Bioreaktor zum Patienten zurück. Der Stoffaustausch erfolgt über Diffusion und Mikrofiltration. Eine kontrollierte, randomisierte Studie an 24 Patienten mit einer durchschnittlichen Behandlungszeit von 72 Stunden brachte keinen Überlebenvorteil. Weitere fünf Patienten mit akutem Leberversagen konnten mit einem modifizierten System überbrückend erfolgreich zur Lebertransplantation gebracht werden [95]. Die Ergebnisse einer aktuellen kontrollierten und randomisierten Studie an 69 Patienten stehen noch aus [96].

b) EISS (Extracorporeal Immune Support System):

Extrakorporale bioartifizielle Immununterstützungssysteme zur Sepsistherapie befinden sich erst am Beginn der klinischen Erprobung. Bei dem im Rahmen dieser Promotionsarbeit eingesetzten Unterstützungssystem handelt es sich um ein zellbasiertes extrakorporales Plasmaperfusionssystem (siehe Abbildung 3). Nach einer Plasmaseparation wird dieses unter kontrollierten Bedingungen mit phagozytierenden Zellen (Granulozyten) von gesunden Spendern in einem an-

geschlossenen Zellkreislauf für eine nur begrenzte Zeit in direkten Kontakt gebracht [97]. Hierbei wird zum einen partikuläres antigenes Material (z. B. Zelltrümmer, Bakterienbruchstücke, Immunkomplexe) aus dem Plasma entfernt, zum anderen wird eine Immunstimulation durch Zytokinfreisetzung aus den Phagozyten initiiert, die zur Unterstützung des Immunsystems bei septischen Patienten führen soll. Nach dieser Aufreinigung des Plasmas wird es wieder zum Patienten zurückgeleitet. In einem Schweine-Sepsis-Modell konnte die Wirksamkeit dieser Therapie nachgewiesen werden [98].

Die Verträglichkeit solch einer Therapie wurde in der EISS-I-Studie getestet (bisher unveröffentlichte Resultate). Im Rahmen dieser Phase-I-Studie wurden zehn Patienten mit einem septischen Schock eingeschlossen und je zweimal über jeweils sechs Stunden behandelt.

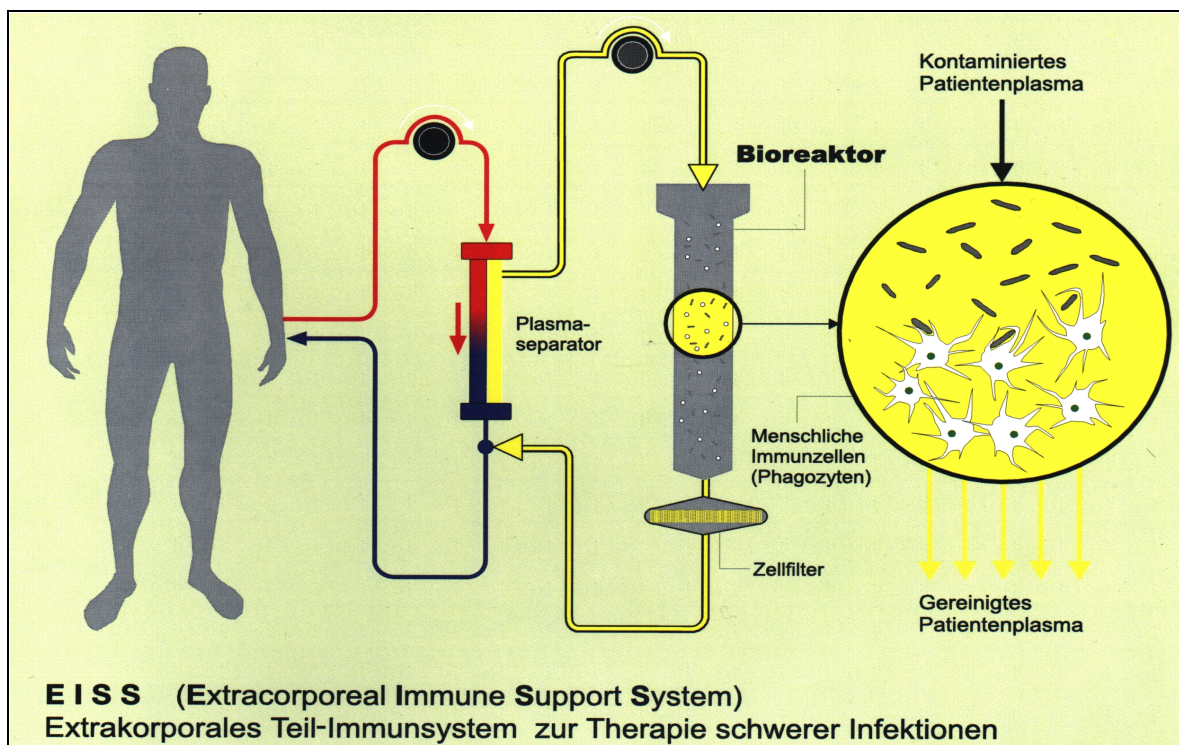


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des EISS-Therapieverfahrens

Die Probanden der EISS-I-Studie wurden ebenfalls in die Pilotstudie mit dem Leberfunktionsbiosensor eingeschlossen, die Gegenstand der vorliegenden Promotionsschrift ist.

2. Zielsetzung

Grundlage dieser Promotion ist ein Zytotoxizitätstest (Biosensor) basierend auf der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2/C3A. Der Test wurde als Diagnostikum zur Früherkennung eines Leberversagens patentrechtlich geschützt.

Ziel der Promotionsarbeit ist es, eine Pilotstudie mit Patienten im septischen Schock und zum Vergleich mit intensivpflichtigen Patienten ohne eine Sepsis sowie mit gesunden Probanden durchzuführen. Dabei wird das Patientenplasma auf die Sensorzellen gegeben und nach einer Inkubationszeit kann eine etwaige Schädigung auf zellulärer Ebene erfasst werden. Parameter sollen die Vitalität der Sensorzellen, die Proteinsynthese und der Aktivierungsgrad auf mitochondrialer und P450-Enzymsystemebene sein. Letztendlich können dann die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit den klinischen Daten, insbesondere Leberfunktions- und Entzündungsmarker, der eingeschlossenen Patienten korreliert werden.

Daneben sollen in die Pilotstudie septische Patienten eingeschlossen werden, die mit dem extrakorporalen bioartificialen Immununterstützungssystem EISS (Extracorporeal Immune Support System) behandelt werden. Im Rahmen der Therapie der septischen Patienten durch EISS wird untersucht, ob Effekte des Patientenplasmas im Vergleich vor und nach einem Behandlungszyklus durch den vorgestellten Zytotoxizitätstest als Biosensor auf zellulärer Ebene nachweisbar sind.

3. Material und Methoden

3.1 Sepsis-Diagnostik-Studie

3.1.1 Studienpopulation

Im Rahmen einer Pilotstudie wurden zwischen November 2003 und Februar 2004 auf einer anästhesiologischen, auf einer chirurgischen und auf einer internistisch geführten Intensivstation (ITS) der Universität Rostock 15 Patienten eingeschlossen. Außerdem wurden 13 gesunde freiwillige Probanden für die Untersuchungen gewonnen.

Die Patienten bzw. die Probanden wurden in folgende drei Gruppen eingeteilt:

- **ITS-S (= ITS – Sepsis):** 10 intensivpflichtige Patienten mit septischem Schock

Diese Gruppe wurde für die Auswertung anhand der 28-Tage-Letalität weiter in überlebende (= **ITS-S/ü**) und nicht überlebende (= **ITS-S/nü**) Patienten unterteilt.

- **ITS-KS (= ITS – keine Sepsis):** 5 intensivpflichtige Patienten ohne Zeichen einer Sepsis (= Kontrollgruppe I)

- **GP (= gesunde Probanden):** 13 gesunde freiwillige Probanden (= Kontrollgruppe II).

Die Patientengruppe ITS-S erfüllte die Kriterien eines septischen Schocks nach den gemeingültigen Sepsiszeichen der Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine (siehe Abschnitt 1.3) [30]. Die Schwere eines Organversagens wurden nach den Kriterien der PROWESS-Studie (siehe Abschnitt 1.3) eingeschätzt und beschrieben [31], mit dem Unterschied, dass ein bereits bestehender Leberschaden kein Ausschlusskriterium darstellte.

In dieser Arbeit wurde zur Erfassung einer bestehenden Leberdysfunktion der in neueren Studien pragmatisch verwendete Serum-Bilirubinwert $> 34,2 \mu\text{mol/l}$ innerhalb der ersten 48 Stunden nach Aufnahme übernommen (siehe Abschnitt 1.3).

Ausschlusskriterien:

- Aktive Hepatitis B und/oder C
- Herzinsuffizienz im klinischen Schweregrad IV nach der NYHA-Klassifikation (New York Heart Association)
- HIV-Infektion
- Aktive Blutung
- Alter < 18 Jahre
- Schwangerschaft und Stillzeit.

3.1.2 Durchführung der Pilotstudie

Die Studienteilnahme erfolgte freiwillig und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde nach Aufklärung von allen Probanden/Patienten bzw. deren gesetzlichen Vertretern erteilt. Ein Ethikantrag wurde eingereicht und bewilligt (Reg.-Nr. II HV 16/2005 der Ethikkommission).

Die Therapie zur Behandlung der Sepsis entsprach den aktuell gültigen Empfehlungen der Sepsis Survival Campaign [99].

Vor Studieneinschluss wurden neben den allgemeinen Angaben (Geschlecht, Alter) auch die Aufnahmediagnose sowie relevante Vor- und Begleiterkrankungen der Studienteilnehmer erfasst. Zur quantitativen Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung und zur objektiven Beschreibung der Organfunktion wurden als Scores der APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II), der SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) und der SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) sowie die GCS (Glasgow Coma Scale) erhoben. Des Weiteren wurden die mikrobiologischen Befunde dokumentiert. Die Patienten wurden im Verlauf der Studie über vier Wochen beobachtet und die 28-Tage-Letalität sowie die Krankenhausletalität erfasst.

Blutentnahmen:

- 1) Bei allen Studienteilnehmern (ITS-S, ITS-KS und GP) erfolgte zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (Zeitpunkt 0 h) eine Blutentnahme (ca. 20 ml). Diese wurde am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsklinik Rostock für die Bestimmung folgender laborchemischer Parameter verwendet: ALAT (U/l), ASAT (U/l), Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$), Harnstoff (mmol/l) und Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von C-reaktivem Protein (CrP in mg/l), Thrombozyten (GpT/l), Leukozyten (GpT/l), Thromboplastinzeit (Quickwert in %), International Normalized Ratio (INR) sowie die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT in s) bei den Studienteilnehmern ITS-S und ITS-KS. Ammoniak ($\mu\text{mol/l}$), Laktat (mmol/l) und Procalcitonin (PCT in ng/ml) wurden lediglich bei den intensivpflichtigen Patienten mit septischen Schock bestimmt.
- 2) Zusätzlich erfolgte bei allen Studienteilnehmern zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (Zeitpunkt 0 h) eine weitere Blutentnahme (Lithium-Heparin-Plasmaprobe) für die Testung auf Zytotoxizität mit dem in dieser Promotion vorgestellten Biosensor.
- 3) Die zehn Patienten mit septischem Schock (ITS-S) wurden im Rahmen einer Phase-I-Studie bei der Behandlung mit einem extrakorporalen Plasma-perfusionssystem (EISS-System; siehe Abschnitt 1.5) rekrutiert. Bei dieser Studie wurden die Patienten je zweimal über sechs Stunden behandelt. Pro Proband wurde jeweils vor bzw. nach der Behandlung mit dem EISS-System eine Lithium-Heparin-Plasmaprobe (10 ml) entnommen, so dass im Verlauf insgesamt vier Plasmaproben pro Patient mit dem Zell-Biosensor untersucht wurden. Diese Blutentnahmen erfolgten zum Zeitpunkt 0, nach sechs Stunden (d. h. vor und nach der ersten EISS-Behandlung) sowie nach 48 bzw. 54 Stunden (vor und nach der zweiten EISS-Behandlung).

Multiorgandysfunktionssyndrome wie der septische Schock werden, da sie bezüglich der betroffenen Organsysteme und dem Schweregrad der Dysfunktion variabel sind, durch Punktsummen-Systeme wie den APACHE II-Score, den SOFA-Score oder den SAPS II-Score beschrieben. Scores können dabei eine prognostische Einschätzung des Patienten in Form von Wahrscheinlichkeiten liefern und Hilfestellung für das weitere Therapieregime liefern. Unter Abschnitt 7.1.1 im Anhang dieser Promotionsarbeit sind die klinischen Parameter, die in die einzeln beschriebenen Scores eingehen, tabellarisch aufgelistet.

Verwendete Scores:

- **APACHE II:** Bei diesem Risiko-Score handelt es sich um ein intensivmedizinisches Klassifikationssystem zur quantitativen Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung und damit einer Prognose für die Überlebenschance des Patienten vor Beginn einer spezifischen Therapie. Eine Vorerkrankung der Leber mit der Folge einer schweren Organinsuffizienz geht in diesen Score mit ein [100].
- **SOFA:** 1996 veröffentlichten Experten der European Society for Intensive Care Medicine (ESICM) den festgelegten Konsens zur objektiven Beschreibung der Organdysfunktion [101]. Grundlage der Bewertung ist die tägliche Erhebung (24-Stunden-Zeitraum) der jeweils schlechtesten Werte für jedes von sechs ausgewählten Organsystemen in vier Schweregraden. Es erlaubt somit die tägliche Entwicklung von Organdysfunktionen, wobei die Leberfunktion Bilirubin-basiert erfasst wird.
- **SAPS II:** Dieser intensivmedizinische Score, der 1984 von Le Gall veröffentlicht wurde, ermöglicht eine Aussage über die Schwere einer akuten Erkrankung sowie die Abschätzung der Krankenhaussterblichkeit [102]. Die Bewertung erhebt und gewichtet verschiedene physiologische und anamnestische Daten. Auch bei diesem Score erfolgt die Erfassung der Leberfunktion Bilirubin-basiert.
- **GCS:** Die Einteilung nach Teasdale und Jennett aus dem Jahre 1974 ist Bestandteil verschiedener Scoring-Systeme und dient als einfache Skala zur Abschätzung einer Bewusstseinsstörung [103].

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung und Revitalisierung der HepG2/C3A-Zellen

Für den auf humanen Hepatozyten basierenden Zytotoxizitätstest (Biosensor) wurden HepG2/C3A-Hepatoblastomzellen verwendet, die von der American Type Culture Collection bezogen (ATCC-CRL-10741) wurden [104]. Bei den HepG2/C3A-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die im adulten adhärenen Zustand als Testzelle genutzt wurde [77].

Für den Biosensor wurden HepG2/C3A-Zellen unter sterilen Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂-Begasung) in 75 T-Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit 4 bis 20 ml Nährmedium kultiviert. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium ohne Phenolrot (= DMEM; Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) verwendet [105]. Dieses wurde mit 10%igem fetalen Kälber-Serum (= FKS; PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), 1%iger Glutamin-Lösung (PAA Laboratories) und 1%iger Antibiotika-Lösung (Penicillin G: 10 000 IE/ml / Streptomycin: 10 mg/ml; PAA Laboratories) substituiert.

Zur Kryokonservierung (die eine Lagerung der Zellen über lange Zeiträume ermöglicht) wurden die HepG2/C3A-Zellen in Tubes (Greiner Bio-One) in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingelagert, die als kryoprotektive Substanz in 2 ml Zellmedium (10 % FKS + 1 % Glutamin + DMEM) mit 10%igem Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland) jeweils 2×10^7 Zellen enthielten. Durch das Anlegen einer Working-Zellbank wurde sichergestellt, dass alle verwendeten Zellen für diese Studie aus demselben Pool stammten und damit dieselben Eigenschaften aufwiesen.

Im Rahmen der Revitalisierung wurde das DMSO nach dem Auftauen durch Abzentrifugieren und nachfolgendes Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline = PBS, pH 7,4; PAA Laboratories) vollständig entfernt. Danach wurden die Zellen in das oben beschriebene Zellmedium überführt und nach Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One) ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden, danach dreimal pro Woche. Die zur

Einsaat relativ hohe Zellzahl zeigte im Vergleich zu eigenen Vorversuchen eine stärkere Proliferation und ermöglichte so eine schnellere Anzucht der Zellkultur.

Die verwendete Hepatozytenlinie wuchs adhärent, die Zellen proliferierten so lange, bis bei bestehenden Kontaktinhibition die gesamte Substratoberfläche durch einen einschichtigen zusammenhängenden Zellrasen (= Monolayer) bedeckt war. Für die weitere Anzucht war eine Subkultivierung (= Passagieren) notwendig, wobei der Zellrasen mit dem PBS zweimal gewaschen und nachfolgend mit 2 ml proteolytisch wirkender Trypsin-Ethylendiamin-Tetraacetat (= Trypsin-EDTA)-Lösung (0,05 %/0,02 % in Dulbecco's-PBS; D-PBS; PAA Laboratories) versetzt wurde, um dadurch Zelladhärenzen aufzuheben. Die Zellen wurden alle sieben bis zehn Tage gesplittet und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml neu ausgesät, wobei ein maximal zehnfaches Passagieren der Zellkulturen nicht überschritten wurde.

3.2.2 Trypanblau-Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität erfolgte durch die Trypanblaufärbung. Tote und absterbende Zellen haben keine intakte Zellwand, wodurch der Farbstoff in das Zytoplasma diffundieren kann und so die Zellen im Lichtmikroskop blau erscheinen. Auch diejenigen Zellen, die nur schwach blau angefärbt sind, werden als nicht vital gewertet [106]. Zu Beginn des Testes wurde das Medium (siehe oben) vorsichtig abgesaugt, die adhärennten Zellen im Well wurden mit 0,5 ml Trypsin-Lösung (1,25 mg/ml; PAA Laboratories) gelöst und mit 1,5 ml Medium versetzt. Daraufhin erfolgte die Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C unter Schütteln. 25 µl der Zellsuspension wurden mit 75 µl PBS und 100 µl 0,4%iger Trypanblau-Lösung (Gibco BRL, Life Technologies) vermischt, über eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und 9 µl des Gemisches in die Zählkammer nach Neubauer pipettiert. Die Anzahl vitaler und nicht-vitaler Zellen pro Großquadrat der Zählkammer multipliziert mit dem Faktor 10^4 ergeben die Gesamtzellzahl/ml. Die Vitalität in Prozent angegeben berechnet sich aus dem Quotienten von Lebendzellzahl $\times 10^2$ und der Gesamtzellzahl.

3.3 Durchführung des Zytotoxizitätstests (Biosensor)

3.3.1 Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450-Isoenzym 1A2

Die Cytochrom P450-Superfamilie besteht aus mikrosomalen Hämoproteinen, die für den oxidativen, peroxidativen und reduktiven Stoffwechsel einer Vielzahl von endogenen Stoffen sowie für den Abbau von Fremdstoffen (Pharmaka, Xenobiotika) eine zentrale Bedeutung haben. Diese Hämoproteine sind sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch in den Mitochondrien lokalisiert. Die Funktion von Cytochrom P450-Isoenzym 1A2 (CYP 1A2) liegt hauptsächlich im Fremdstoffmetabolismus (Umwelt- und Nahrungsgifte, Pharmaka). Der EROD-Test ist eine Methode zur Bestimmung der CYP 1A2-Aktivität [107, 108].

Durchführung:

HepG2/C3A-Zellen wurden in 24-Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-One) in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well für vier Stunden zum Adhärenieren eingesät und mit 1 ml Medium versetzt. Danach wurden die Zellen unter täglichem Mediumwechsel für drei Tage inkubiert, wobei dem Medium jeweils 3-Methylcholanthren (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration von 5,36 g/l (20 $\mu\text{mol/l}$) zugesetzt wurde, um eine Erhöhung der CYP 1A2-Aktivität in den Zellen auszulösen [108].

Vom vierten bis zum sechsten Tag wurden die Zellen mit 0,5 ml Probandenplasma und 0,25 ml Medium bei 37 °C und Begasung mit 5%igem CO₂ inkubiert.

Die Aktivitätsmessung fand am sechsten Tag nach der Einsaat der Zellen statt. Zuerst wurde überschüssiges Zellkulturmedium und Probandenplasma abgesaugt und durch zweimaliges Spülen mit dem PBS von eventuellen Rückständen befreit. Danach erhielten die Zellen 0,5 ml DMEM (ohne 10%iges FKS) sowie Ethoxyresorufin (8 $\mu\text{mol/l}$; Molecular Probes, Eugene, USA) und Dicumarol (10 $\mu\text{mol/l}$; Aldrich, Milwaukee, USA). Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Dabei wurde ein Teil des Ethoxyresorufins von den HepG2/C3A-Zellen zu Resorufin umgewandelt. Das Dicumarol hatte die Aufgabe, eine weitere Verstoffwechslung des entstandenen Resorufins zu verhindern.

Nachfolgend wurden aus jedem Well 2 x 75 µl für die Doppelbestimmungen entnommen und in eine schwarze 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) überführt. Es wurden 15 µl einer Lösung von β-Glucuronidase (15 Fishman Units; Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und Arylsulfatase (120 Roy Units; Roche Diagnostics) hinzugegeben [109, 110], um sämtliche eventuell gebildeten Resorufinkonjugate zu hydrolisieren. Im Anschluss fand eine erneute Inkubation für drei Stunden bei 37 °C unter Schütteln mit maximal 600 U/min statt. Danach wurden 200 µl Ethanol (absolut; 99,9 %; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in jedes Well pipettiert und nach weiteren 5 bis 10 Minuten konnte der Resorufin-Gehalt der Proben am Fluoreszenz-Reader (Fluoroskan Ascent, MTX Laboratory Systems, Vienna, USA) bei einer Anregung von 530 nm und einer Emission von 584 nm gemessen werden.

Um die Fluoreszenzen in Resorufin-Mengen umrechnen zu können, wurde bei jedem Versuch zur Quantifizierung eine Resorufin-Standardkurve angefertigt (Leerprobe – 10 pmol – 20 pmol – 40 pmol – 80 pmol).

Jeder Testansatz sowohl des Patientenplasmas als auch der Mediumkontrolle wurde zweifach angesetzt und jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.3.2 Messung der Proteinbiosynthese von Mikroalbumin

Die Albuminsynthese findet ausschließlich in den Hepatozyten statt und stellt einen wichtigen Parameter der Hepatozytenfunktion dar [111].

Durchführung:

Die HepG2/C3A-Zellen wurden in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 24-Well-Zellkulturplatten eingesät und nach circa vier Stunden Adhärenzzeit mit 0,5 ml Probandenplasma und 0,25 ml Medium versetzt. Nach einer Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für drei Tage wurde einmal mit 1 ml Medium gespült und anschließend mit 1 ml frischem Medium erneut für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde aus 200 µl zellfreiem Kulturüberstand und den mitgeführten Mediumkontrollen die Mikroalbumin-Konzentration ermittelt. Jeder Testansatz sowohl des Patientenplasmas als auch der Mediumkontrolle wurde zweifach angesetzt und es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Mikroalbumin-Bestimmung erfolgte durch das Medizinische Labor Rostock mithilfe der kinetischen Immunnephelometrie unter der Leitung von Dr. med. Goran Matić. Die Methode basiert auf einer Immunreaktion, bei der das zu bestimmende Antigen (bei dieser Studie Mikroalbumin) gelöst im Kulturüberstand vorliegt und mit den gegen sie gerichteten Antikörpern unlösliche Antigen-Antikörper-Komplexe ausbildet. Die Zunahme der durch die Präzipitate verursachten Trübung im Testansatz wird mit einem Nephelometer (Image 800; Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) gemessen und ist proportional zu der Konzentration des zu messenden Antigens [112].

3.3.3 Bestimmung von Vitalität und Proliferation

Die drei unter diesem Abschnitt beschriebenen Biosensor-Tests dienen der Bestimmung von Vitalität und Proliferation.

Die Anzucht der Hepatozyten erfolgte hierbei für die ersten sechs Tage bis zur weiteren und speziellen Bestimmung gleich. Die HepG2/C3A-Zellen wurden in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 24-Well-Zellkulturplatten eingesät und nach ca. vierständiger Adhärenzzeit mit 0,5 ml Probandenplasma und 0,25 ml Medium versetzt. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde einmalig mit 1 ml Medium gespült und anschließend 1 ml frisches Medium zugesetzt und erneut für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der sechstägigen Anzucht der Hepatozyten wurden dann die weiteren Testansätze des Biosensors (der XTT-Test, die Messung des LDH-Gehaltes im Kulturüberstand und der Live/Dead-Test) durchgeführt.

3.3.3.1 XTT-Test

Im XTT-Test (Roche Diagnostics) wird die Umsetzung des gelben Tetrazoliumsalzes in vitalen Zellen durch die aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen gemessen [113]. Dabei entsteht durch metabolisch aktive Zellen aus dem gelben Tetrazoliumsalz XTT das wasserlösliche orangefarbene Formazan [114]. Eine solche Umwandlung findet hingegen bei toten Zellen mit avitalen Mitochondrien

nicht statt, da das in den Mitochondrien lokalisierte intrazelluläre Reduktionssystem inaktiv ist.

Durchführung:

Für den XTT-Test wurde das Medium nach Anzucht der Hepatozyten vorsichtig abgesaugt und 0,5 ml frisches Medium ohne FKS sowie 0,25 ml XTT-Reagenz in einer Konzentration von 1 mg/ml hinzugefügt. Es erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C unter Standardbedingungen. Die Absorption des entstandenen Formazans wurde spektrophotometrisch nach vier Stunden am Mikroplatten-ELISA-Reader (Anthos Reader 2001, Anthos Labtec Instruments, Wals-Siezenheim, Österreich) bei definierter Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt, wobei die Intensität der Farbe proportional zur Zahl der metabolisch aktiven Zellen sein soll [115]. Dazu wurden aus jedem Well 2 x 100 µl für die Doppelbestimmungen entnommen und in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) umgefüllt. Die Messungen der Extinktionen erfolgten als Doppelbestimmungen, außerdem wurden jeweils Mediumkontrollen mitgeführt.

3.3.3.2 LDH-Freisetzung

Die Messung der LDH-Freisetzung wurde im Zellkulturüberstand bestimmt und stellt einen weiteren Proliferation- und Vitalitätstest dar [116]. LDH ist ein stabiles, im Zytoplasma aller Zellen vorkommendes Enzym, das eine Schlüsselstellung im anaeroben Stoffwechsel der Zelle einnimmt. Es katalysiert je nach pH-Wert die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat (und umgekehrt), als Coenzym dient dabei NADH (bzw. NAD):

Reaktionsgleichung: $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Laktat} + \text{NAD}^+$

Durchführung:

Nach erfolgter sechstägiger Anzucht (siehe Abschnitt 3.3.3) wurde im Anschluss aus 200 µl zellfreiem Kulturüberstand sowie einer mitgeführten Mediumkontrolle die LDH-Aktivität photometrisch als Doppelbestimmung ermittelt. Jeder Versuchsansatz mit Probandenplasma wurde ebenfalls als Doppelbestimmung durchgeführt. Die LDH-Bestimmung erfolgte methodisch als kinetisch-optischer Test

nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) [117]. Die Bestimmungen wurden am EDV-gestützten Analysenautomaten (Cobas Mira, Roche Diagnostics) spektralphotometrisch bei 340 nm durchgeführt, wobei der Verbrauch des Coenzym NADH + H⁺ als Maß für die LDH-Aktivität gilt.

3.3.3.3 Life/Dead-Färbung

Der Life/Dead-Test dient zur simultanen Identifizierung lebender und toter Zellen durch zwei Fluoreszenz-Marker (Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1), die verschiedene Parameter der Zellvitalität erkennen: die intrazelluläre Esterase-Aktivität oder die Integrität der Plasmamembran [82].

Das nicht-fluoreszierende zellwandpermeable Esterasesubstrat Calcein-AM (Calcein-Aceton-Methylester) diffundiert durch Zellmembranen und wird im Zytoplasma enzymatisch zu fluoreszierendem Calcein hydroxyliert. Dieses bildet mit Calciumionen Chelate, welche die Zelle nicht verlassen können. Die Esteraseaktivität ist nur in vitalen Zellen zu finden, so dass die lebende Zelle durch gleichmäßige grünliche Fluoreszenz im Zytoplasma erkennbar ist. Der zweite, rot-fluoreszierende Farbstoff Ethidium Homodimer-1 hingegen kann nur in avitale Zellen mit beschädigten Membranen eindringen und interkaliert in die zelluläre DNA [118].

Durchführung:

Wie bei den beiden vorhergehenden Vitalitätstests erfolgte eine sechstägige Anzucht der HepG2/C3A-Zellen (siehe Abschnitt 3.3.3) in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 24-Well-Zellkulturplatten. Nach Absaugen des Mediums wurden 0,5 ml Live/Dead-Reagenz (Calcein-AM 2 μ M, Ethidium Homodimer-1 4 μ M; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation der Zellen im Brutschrank unter Standardbedingungen wurden die Zellen mit monochromatischem Licht photographiert (Nikon F-601 M, Tokyo, Japan). Die Calcein-Chelate emittierten bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm, wohingegen die Nukleinsäure-Fluoreszenzkomplexe bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm und einer

emittierten Wellenlänge von 642 nm mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot 300, Tokyo, Japan) sichtbar und photographisch dokumentiert wurden.

3.4 Statistische Methoden

Bei den vorliegenden relativ geringen Patientenzahlen war von einer Normalverteilung nicht auszugehen. Darum wurden die entsprechenden parameterfreien Tests (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test, Friedman-Test, Wilcoxon-Test) verwendet [119].

Um die ordinalskalierten Variablen zwischen den unabhängigen Patientengruppen zu unterscheiden, wurde im Rahmen einer Varianzanalyse der Kruskal-Wallis-Test für mehrere unabhängige Stichproben angewandt. Die Ergebnisse wurden bei vorhandenen Signifikanzen durch den Mann-Whitney-U-Rangsummentest als paarige Stichproben weiter überprüft.

Der Friedman-Test wurde zum Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben benutzt, um signifikante Unterschiede der Messwerte zu den verschiedenen Messzeitpunkten (0, 6, 48 und 54 Stunden nach Patienteneinschluss der ITS-S-Gruppe) zu ermitteln. Im Falle vorhandener Unterschiede kam der Wilcoxon-Vorzeichentest für zwei abhängige Stichproben zur Anwendung. Für alle statistischen Tests wurde die Aussage bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant erachtet.

Der Spearman-*rho*-Test wurde bei nicht normalverteilten Merkmalen bzw. Daten angewandt, um die bivariate Rangkorrelationsanalyse zwischen den klinischen Daten und den Ergebnissen des Biosensors zu berechnen.

Die Anfertigung und Berechnung der beschreibenden Statistik (Mittelwert, Standardabweichung) sowie die graphische Darstellung durch Diagramme erfolgte mithilfe von Excel Office XP™ unter Windows XP-Home von Microsoft (Microsoft Corporation, Seattle, USA). Die statistische Datenanalyse wurde mit SPSS® Software Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) unter Windows XP-Professional durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika der Sepsis-Diagnostik-Studie

Die in dieser Arbeit vorgestellte diagnostische Untersuchung, bei der in einem selbst entwickelten Biosensorsystem unter Verwendung humaner Hepatozyten Probandenplasma mit dem Zell-Biosensor (HepG2/C3A-Zellen) inkubiert wurde, ist insgesamt an 28 Patienten bzw. Probanden durchgeführt worden. Die Teilnehmer wurden in eine Test- und zwei Kontrollgruppen eingeteilt, wobei die Testgruppe anhand der 28-Tage-Letalität nochmals in zwei Subgruppen (überlebende und nicht überlebende Patienten) unterteilt wurde (siehe Abschnitt 3.1.1).

Die Zusammenfassung der in dieser Pilotstudie erhobenen Patientencharakteristika, die genauen Ergebnisse der Laborparameter, Infektionsquellen und Lokalisation der Organversagen sind in den Tabellen 3 bis 5 aufgelistet.

Die 28-Tage-Letalität der ITS-S-Gruppe betrug 30 %. Insgesamt verstarben vier Patienten dieser Gruppe während des Krankenhausaufenthaltes, sechs Patienten konnten mit stabilen Kreislaufverhältnissen aus dem Krankenhaus entlassen werden. Alle Patienten bzw. Probanden der ITS-KS- sowie der GP-Gruppe überlebten.

Der mittlere APACHE II-Score-Wert der ITS-S-Gruppe lag im Vergleich zu der ITS-KS-Gruppe doppelt so hoch und war statistisch signifikant ($p = 0,003$), Gleiches gilt für die erhobenen SOFA-Score-Werte ($p = 0,008$). Im Vergleich zur nicht-septischen Kontrollgruppe lagen die SAPS II-Werte für die ITS-S-Gruppe um ca. ein Drittel höher und waren ebenfalls signifikant ($p = 0,040$). Die Werte der GCS zeigten im Vergleich der ITS-S-Gruppe zu beiden Kontrollgruppen statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,019$ und $p = 0,001$).

Acht von zehn Patienten der septischen ITS-S-Gruppe und alle Patienten der nicht-septischen ITS-KS-Gruppe waren chirurgisch behandelte Fälle.

Zwei Probanden der ITS-KS-Gruppe waren bei bekannter terminaler Niereninsuffizienz chronisch dialysepflichtig.

Tabelle 3: Patientencharakteristika, Krankheitsschwere, Vorerkrankungen und klinisches Outcome beider intensivpflichtiger Testgruppen

Patient	Diagnosen bei ITS-Aufnahme	Alter	Geschlecht	relevante Begleiterkrankungen	APACHE II: ITS-Aufn./ Stud.-einschl.	SOFA: ITS-Aufn./ Stud.-einschl.	SAPS II: ITS-Aufn./ Stud.-einschl.	Krankenhaus-Letalität
ITS-S 1	Pneumonie, Ateminsuffizienz, Bakteriämie, ANI, septischer Schock	60	männlich	Alkoholabusus, Krampfleiden	37 / 32	15 / 16	96 / 80	überlebt
ITS-S 2	Nekrotisierende Pankreatitis, Pneumonie, Ateminsuffizienz, septischer Schock	32	w eiblich	Alkoholabusus, Delir, Pleuraerguss	27 / 30	12 / 11	61 / 61	überlebt
ITS-S 3	Pneumonie, Ateminsuffizienz, Harnwegsinfekt, septischer Schock	68	w eiblich	Ichämische Herzkrankheit, Epilepsie, art. HT	30 / 33	12 / 11	66 / 58	verstorben an Tag 18
ITS-S 4	Pneumonie, Ateminsuffizienz, Bakteriämie, Leberversagen, ANI, septischer Schock	69	männlich	Leberzirrhose, COPD, Diabetes mellitus Typ II	37 / 31	17 / 17	72 / 73	verstorben an Tag 9
ITS-S 5	Kardiopulmonare Reanimation, Pneumonie, Ateminsuffizienz, septischer Schock	50	männlich	Alkoholabusus, koronare Herzkrankheit, Enzephalopathie	36 / 26	11 / 13	83 / 66	überlebt
ITS-S 6	Mediastinitis, Pneumonie, Ateminsuffizienz, Leberversagen, ANI, septischer Schock	60	männlich	Alkoholabusus, Delir, HRST	27 / 31	14 / 13	70 / 59	überlebt
ITS-S 7	Hüft-TEP-Infektion, Bakteriämie, ANI, Ateminsuffizienz, septischer Schock	69	w eiblich	Diabetes mellitus, art. HT, Adipositas	21 / 25	8 / 6	35 / 47	verstorben an Tag 40
ITS-S 8	Postoperative Schocksymptomatik nach aortokoronarem Bypass, ANI, Pneumonie, Ateminsuffizienz, septischer Schock	76	männlich	Ischämische Herzkrankheit, kardiale Stauungsinsuffizienz, art. HT	38 / 21	13 / 9	74 / 52	überlebt
ITS-S 9	Nierenabszess, ANI, Leberversagen, septischer Schock	46	w eiblich	Polyzystische Leberdegeneration, renaler HT, Niereninsuffizienz	29 / 21	8 / 12	72 / 40	überlebt
ITS-S 10	Thorakale Wundinfektion nach Sternumresektion, Bakteriämie, Ateminsuffizienz, ANI, septischer Schock	73	w eiblich	Mamma-Karzinom, Hyperthyreose	17 / 31	8 / 11	33 / 70	verstorben an Tag 6
ITS-KS 1	Coxarthrose	70	w eiblich	Mamme-Karzinom, Osteoporose, Z.n. Ulcus ventriculi, Pflasterallergie	8	1	27	überlebt
ITS-KS 2	Hüftkopfnekrose	90	w eiblich	art. HT, Presbyakusis	10	1	30	überlebt
ITS-KS 3	Gonarthrose	69	w eiblich	art. HT, Diabetes mellitus Typ II, Adipositas	8	3	30	überlebt
ITS-KS 4	Mechanischer Dünndarmileus bei Konglomerattumor	83	männlich	HRST, NIDDM, art. HT, Z.n. Harnblasen-Ca; terminale Niereninsuffizienz (Dialyse)	16	7	53	überlebt
ITS-KS 5	Hämatomausräumung der Herzschrittmacher-Tasche, Wundrevision	77	männlich	Terminale Niereninsuffizienz (Dialyse), COPD, HRST, Herzschrittmacher-Träger, art. HT	17	8	42	überlebt

ANI = akute Niereninsuffizienz
 art. HT = arteriellerer Hypertonus
 Aufn. = Aufnahme

COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
 HRST = Herzrhythmusstörungen
 NIDDM = Nichtinsulinpflichtiger Diabetes mellitus

Stud.-Einschl. = Studieneinschluss
 TEP = Totale Endoprothese
 Z.n. = Zustand nach

Bei den laborchemisch bestimmten Parametern wiesen die Probanden der gesunden Kontrollgruppe II (= GP) durchweg normwertige Blutwerte auf.

Bei den leberspezifischen Parametern zeigten die Transaminasen der septischen Patienten (= ITS-S) deutlich erhöhte Werte zu den Kontrollgruppen auf, signifikante Unterschiede ließen sich im direkten Vergleich zu den gesunden Probanden feststellen (ALAT in U/l: $p = 0,001$; ASAT in U/l: $p = 0,003$).

Außerdem zeigten die Patienten der ITS-S-Gruppe im Mittel deutlich erhöhte bis pathologische Bilirubinwerte, die signifikant höher als die jeweils physiologischen Werte der beiden Kontrollgruppen (ITS-KS und GP) lagen (Bilirubin in $\mu\text{mol/l}$: $p = 0,040$ und $p = 0,004$).

Bei den Gerinnungsparametern fielen beim Vergleich der untersuchten Gruppen statistisch signifikant höhere INR-Werte der septischen Patienten zur nicht-septischen Kontrollgruppe auf (INR-Werte: $p = 0,013$).

Auch die ermittelten Harnstoffwerte wiesen signifikante Unterschiede zwischen der septischen Testgruppe und den gesunden Probanden auf (Harnstoff in mmol/l : $p = 0,001$).

Bei der Unterteilung der ITS-S-Gruppe in überlebende und nicht überlebende Probanden zeigten sich beim Bilirubinwert signifikante Unterschiede im Vergleich der überlebenden septischen Patienten zu beiden Kontrollgruppen.

Zusätzlich zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich zur nicht-septischen Kontrollgruppe beim INR-Wert und im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bei den Transaminasen sowie den Retentionswerten.

Bei der Betrachtung der nicht überlebenden septischen Probanden zeigten sich bei den Transaminasen und den Harnstoffwerten signifikante Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Die genauen Signifikanzwerte sind tabellarisch im Anhang dieser Arbeit zu finden (siehe Abschnitt 7.1.3).

Tabelle 4: Bei Studienbeginn (Behandlungstag 1 für die ITS-S-Gruppe): Demografische und klinische Charakteristika, Krankheitsschwere für die jeweiligen Studiengruppen (Mittelwert ± Standardabweichung)

	1) ITS – septischer Schock (ITS-S; n = 10)	2) ITS – septischer Schock/überlebt (ITS-S/ü; n = 7)	3) ITS – septischer Schock/nicht überlebt (ITS-S/nü; n = 3)	4) ITS – keine Sepsis (ITS-KS; n = 5)	5) GP – gesunde Kontrollen (GP; n = 13)	statistische Signifikanz (p < 0,05)
Geschlecht (m/w)	5/5	4/3	1/2	2/3	7/6	
ALAT (U/l)	54,7 ± 84,5	64,8 ± 101,3	31,1 ± 14,2	24,4 ± 21,5	10,7 ± 8,8	d, e, f
ASAT (U/l)	94,3 ± 179,3	109,0 ± 216,7	60,2 ± 35,9	33,4 ± 22,9	18,3 ± 4,7	d, e, f
Bilirubin (µmol/l)	33,4 ± 38,2	26,9 ± 24,4	48,3 ± 65,6	9,2 ± 4,0	9,0 ± 4,8	a, b, d, e
Ammoniak (µmol/l)	80,7 ± 3,3	78,4 ± 0,0	83,0 ± 0,0	n.b.	n.b.	Ø
Laktat (mmol/l)	1,6 ± 0,8	1,60 ± 0,9	1,65 ± 0,2	n.b.	n.b.	Ø
CRP (mg/ml)	216,6 ± 134,4	241,6 ± 52,3	158,3 ± 66,5	100,2 ± 66,5	n.b.	Ø
PCT (ng/ml)	14,0 ± 30,2	16,7 ± 36,4	7,6 ± 6,3	n.b.	n.b.	Ø
Thrombozyten (GpT/l)	170,3 ± 112,2	198,6 ± 123,1	104,3 ± 42,7	210,6 ± 66,7	n.b.	Ø
Leukozyten (GpT/l)	11,9 ± 7,5	13,9 ± 7,9	7,1 ± 3,7	8,9 ± 1,9	n.b.	Ø
Harnstoff (mmol/l)	12,7 ± 7,9	11,8 ± 3,9	14,8 ± 15,1	10,9 ± 8,6	4,4 ± 0,7	d, e, f
Kreatinin (µmol/l)	133,7 ± 93,4	149,3 ± 96,6	97,1 ± 91,7	216,4 ± 205,3	72,8 ± 10,0	e
Quick (%)	84,5 ± 15,0	86,7 ± 12,8	79,3 ± 21,5	91,4 ± 5,4	n.b.	Ø
INR	1,23 ± 0,17	1,20 ± 0,13	1,31 ± 0,27	1,06 ± 0,05	n.b.	a, b
aPTT (s)	40,2 ± 9,1	41,9 ± 10,6	36,0 ± 0,75	35,0 ± 6,0	n.b.	Ø
APACHE II	24,2 ± 5,8	22,1 ± 4,1	29,0 ± 7,2	11,8 ± 4,4	n.b.	a, b, c
SOFA	10,1 ± 3,2	9,4 ± 3,0	11,7 ± 3,8	4,0 ± 3,3	n.b.	a, b, c
SAPS II	53,3 ± 14,4	49,6 ± 15,8	62,0 ± 4,6	36,4 ± 10,9	n.b.	a, c
GCS	6,7 ± 5,5	8,3 ± 6,0	3,0 ± 0,0	14,8 ± 0,4	15 ± 0	a, c, d, e, f
Alter (Jahre)	60,3 ± 13,9	56,1 ± 14,8	70,0 ± 2,6	77,8 ± 8,9	39,0 ± 9,6	a, b, d, e, f, g
28-Tage-Mortalität (%)	30 %	0 %	100 %	0 %	0 %	a, d

a = statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ITS-S und ITS-KS
b = statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ITS-S/ü und ITS-KS
c = statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ITS-S/nü und ITS-KS
d = statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ITS-S und GP
e = statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ITS-S/ü und GP

f = statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ITS-S/nü und GP
g = statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ITS-KS und GP
Ø = keine statistische Signifikanz
n.b. = nicht bestimmt

Die Einteilung der Sepsisquelle erfolgte nach der klinischen und/oder mikrobiologisch wahrscheinlichsten Quelle und ist im Einzelnen in Tabelle 5 aufgelistet.

Betrachtet man die dort aufgezeichneten Lokalisationen der Infektionsfoki, so wurden katheterassoziierte Infektionen, gefolgt von beatmungsassoziierten Pneumonien als Hauptinfektionsorte der Sepsis identifiziert. Bei der Einteilung der nachgewiesenen Bakterien nach ihrem Verhalten in der Gramfärbung konnte keine eindeutige Tendenz zwischen gram-positiven und gram-negativen Keimen festgestellt werden. In zwei Fällen waren Mischinfektionen durch Bakterien und Pilze nachweisbar. In zwei Fällen konnte bei den Studienteilnehmern der ITS-S-Gruppe kein relevanter Keimnachweis erbracht werden, klinisch wurde in dem einen Fall eine akute Mediastinitis, im anderen Fall ein Nierenabszess diagnostiziert. Die im Einzelnen erhobenen mikrobiologischen Befunde der ITS-S-Gruppe sind tabellarisch im Anhang dieser Arbeit zu finden (siehe Abschnitt 7.1.2).

Tabelle 5: Quelle der Infektion und Kulturergebnisse der septischen Testgruppe (n = 10)

Sepsisquelle	Anzahl	Kultur-Ergebnisse	Anzahl
pneumogen	7	gram-positiv	5
thorakal	2	gram-negativ	4
urogenital	2	Pilze	2
Katheter/Blut	8		
Andere	1 (TEP-Infektion)		

(TEP = Totale Endoprothese)

Die Einteilung der Organdysfunktionen erfolgte nach den Aufnahmekriterien der PROWESS-Studie (siehe Tabelle 2), die Definition des Leberversagen erfolgte in Anlehnung an neuere Studien, die pragmatisch einen Serum-Bilirubinwert > 34,2 µmol/l verwenden [3, 32, 33]. Die Auflistung der verschiedenen Organversagen der ITS-S-Gruppe wird in Tabelle 6 dargestellt.

Bei allen Patienten der ITS-S-Gruppe kam es zu einem Kreislaufversagen, 90 % der septischen Probanden entwickelten im Beobachtungszeitraum ein beatmungspflichtiges Lungenversagen und sieben Probanden ein akutes Nierenversagen [31]. Drei Probanden wiesen Zeichen der Leberdysfunktion auf (Bilirubin in µmol/l: MW 80,3 µmol/l ± 42,1) und zeigten im Mittel deutlich erhöhte Bilirubinwerte im

Vergleich zu den restlichen sieben Patienten der septischen Gruppe (Bilirubin in $\mu\text{mol/l}$: MW $13,2 \mu\text{mol/l} \pm 4,4$).

Tabelle 6: Organversagen der septischen Testgruppe (n = 10)

Patient	Organversagen
ITS-S 1	Kreislauf, Lunge, Niere
ITS-S 2	Kreislauf, Lunge
ITS-S 3	Kreislauf, Lunge
ITS-S 4	Kreislauf, Lunge, Leber, Niere
ITS-S 5	Kreislauf, Lunge
ITS-S 6	Kreislauf, Lunge, Leber, Niere
ITS-S 7	Kreislauf, Lunge, Niere
ITS-S 8	Kreislauf, Lunge, Niere
ITS-S 9	Kreislauf, Leber, Niere
ITS-S 10	Kreislauf, Lunge, Niere

Zwei dieser Probanden mit den Zeichen des Leberversagens zählten zu den überlebenden Patienten der septischen Testgruppe, lediglich ein Patient verstarb innerhalb der ersten 28-Tage nach Studienbeginn.

Bei Betrachtung der Bilirubinwerte waren diese bei den beiden überlebenden Probanden ca. viermal höher (MW: $55,4 \pm 7,7$), bei dem nicht überlebenden Patienten um das ca. Zehnfache höher (MW: $146,3 \pm 19,4$) als bei den Probanden ohne Zeichen des Leberversagens. Unter der zweimaligen, je sechsständigen Behandlung mit dem EISS-System zeigten die beiden überlebenden Patienten einen Abfall des Bilirubinwertes um etwa 25 % zum Ausgangswert, der nicht überlebende Patient wies nach der ersten Behandlung ebenfalls einen Abfall um knapp 20 % auf, der jedoch nach dem zweiten Zyklus wieder auf den Ausgangswert anstieg. Bei den Patienten ohne Zeichen des Leberversagens war unter der EISS-Behandlung im Verlauf ein Abfall der Bilirubinwerte um etwa 20 % zum Ausgangswert festzustellen.

Bei Betrachtung der Bilirubinwerte und der Letalität ist zusammenfassend festzustellen, dass lediglich ein Proband mit initial und im Verlauf der Pilotstudie erhöhten Bilirubinwerten verstarb, andererseits die beiden anderen nicht überlebenden Probanden bei Studienaufnahme und im Studienverlauf normwertige Bilirubinwerte aufwiesen.

4.2 Ergebnisse des Zytotoxizitätstests (Biosensor)

Im folgenden Teil werden die Messergebnisse nach Inkubation des Probandenplasmas mit den humanen Hepatozyten des Zytotoxizitätstests dargestellt. Hierbei wurden die drei Studiengruppen (ITS-S, ITS-KS, GP) miteinander verglichen, wobei die septischen Probanden (n = 10) für den Verlauf der EISS-Behandlung weiter in die Subgruppen der überlebenden (ITS-S/ü; n = 7) und die der nicht überlebenden (ITS-S/nü; n = 3) Patienten betrachtet wurden.

Durch die Teilnahme der septischen Gruppe an der Sepsis-Therapie-Studie mit dem extrakorporalen Immununterstützungssystem (EISS-I-Studie, siehe Abschnitt 3.1.2) wurde bei jedem Proband dieser Gruppe viermalig (je vor und nach den beiden durchgeführten Behandlungszyklen) eine Messung mit dem Zytotoxizitäts-Biosensor durchgeführt. Die Ergebnisse der ITS-S-Gruppe (n = 39; eine Probe musste verworfen werden) wurden zunächst als septisches Gesamtkollektiv von Einzelergebnissen zusammengefasst, wobei die Subgruppe der überlebenden Probanden insgesamt 27 Messergebnisse (siehe oben), die der nicht überlebenden Probanden insgesamt 12 Messergebnisse ergab.

Nachfolgend wurden die Messwerte der septischen Testgruppe im zeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 48 h und 54 h separat beurteilt.

4.2.1 Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450-Isoenzym 1A2

Abbildung 4 zeigt die CYP 1A2-Aktivität der Sensorzellen bei den verschiedenen Studiengruppen. Die beiden Kontrollgruppen (ITS-KS und GP) wiesen im direkten Vergleich keine signifikanten Unterschiede auf. Nur das Plasma der septischen Gruppe (ITS-S) zeigte nach Inkubation mit den Sensorzellen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen mit einer jeweils um mehr als die Hälfte reduzierten Aktivität eine statistisch signifikante Einschränkung (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$).

Betrachtet man die Subgruppen der septischen Probanden (ITS-S/ü und ITS-S/nü), so wurden auch hier deutlich geringere Werte bestimmt, die signifikant niedriger zu beiden nicht-septischen Kontrollgruppen lagen. So zeigten sich sowohl statistische Signifikanzen im Vergleich der gesunden Probanden zu beiden septischen Subgruppen als auch im Vergleich der nicht-septischen Kontrollgruppe

zu den nicht überlebenden septischen Studienteilnehmern. Auch im direkten Vergleich der Subgruppen untereinander war ein signifikanter Unterschied zwischen den überlebenden und nicht überlebenden septischen Patienten festzustellen. Die genauen Signifikanzwerte finden sich hier im Anhang dieser Arbeit (siehe Abschnitt 7.1.3).

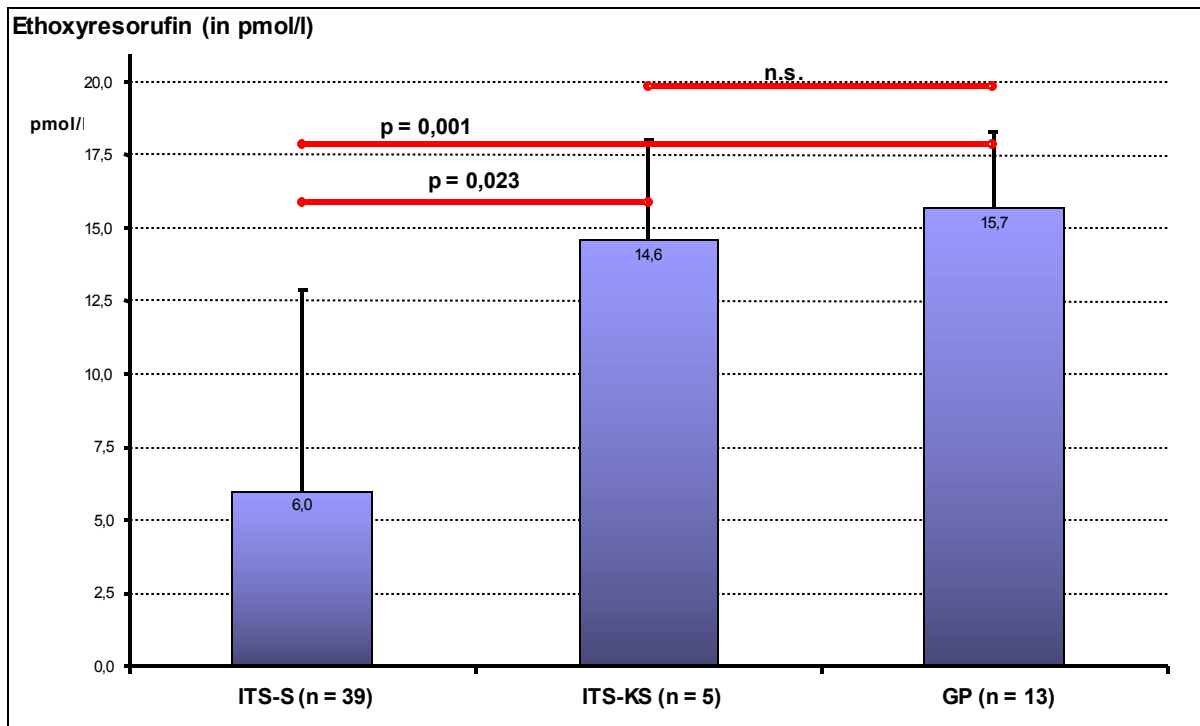


Abbildung 4: Alle Messergebnisse des Ethoxyresorufin-Tests (in pmol/l) der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen (U-Test; n.s. = nicht signifikant)

Abbildung 5 stellt die CYP 1A2-Aktivität der Sensorzellen der septischen Probanden bei der Aufteilung in Subgruppen (überlebende und nicht überlebende Probanden) im zeitlichen Verlauf dar. Es zeigte sich zum einen bei den überlebenden septischen Probanden eine deutlich erhöhte Aktivität mit Steigerungen jeweils nach der Behandlung durch das extrakorporale Immununterstützungssystem EISS. Zum anderen war bei den nicht überlebenden Patienten im Plasma die kontinuierliche Abnahme der CYP 1A2-Aktivität festzustellen, ohne dass ein Einfluss der Therapie ersichtlich wurde. Gerade nach den jeweils 6-stündigen Therapien zu den Zeitpunkten 6 h und 54 h wiesen die Aktivitätsbestimmungen zwischen den überlebenden und den nicht überlebenden Probanden die größten Unterschiede auf. Dennoch blieb der Vergleich beider Subgruppen sowohl im direkten Gruppenvergleich (mittels Mann-Whitney-U-Test) als auch im zeitlichen Verlauf zu den weiteren Messzeitpunkten (mittels Wilcoxon-Test) außerhalb der statistischen Signifikanz (genaue Signifikanzwerte siehe Abschnitt 7.1.3).

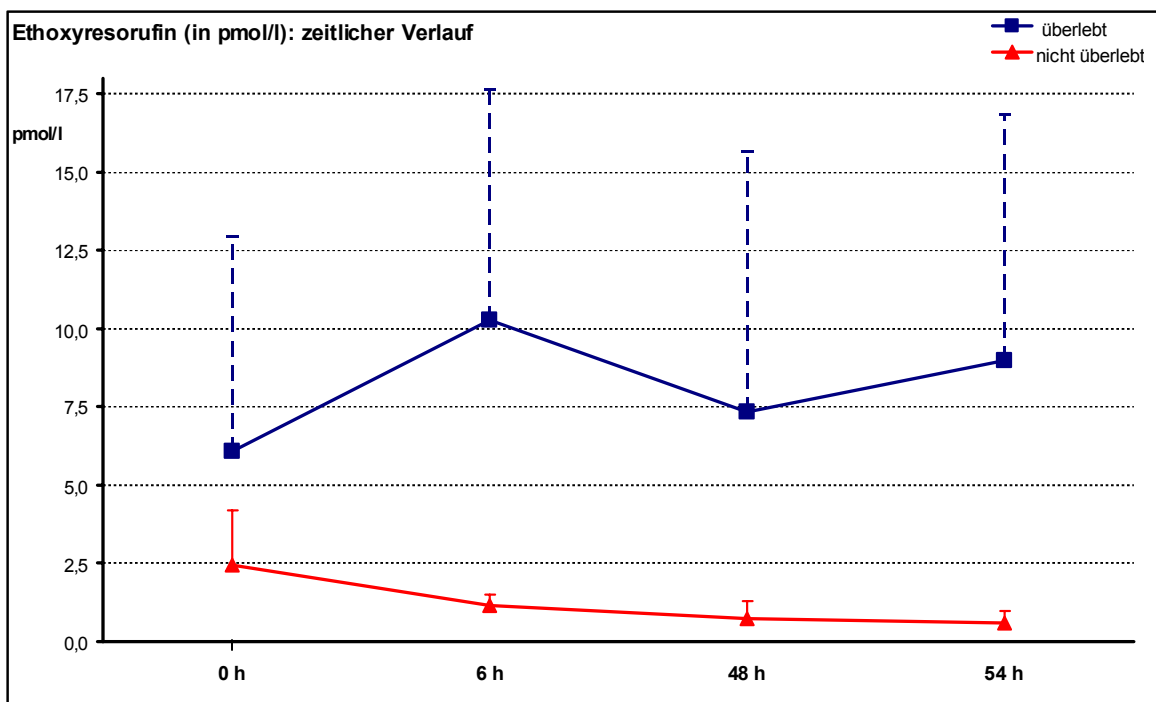


Abbildung 5: Ethoxyresorufin-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Subgruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf. Keine statistische Signifikanz zu den einzelnen Messzeitpunkten oder im Verlauf (U-Test und Wilcoxon-Test)

4.2.2 Messung der Proteinbiosynthese von Mikroalbumin

Abbildung 6 zeigt signifikante Unterschiede bei der Mikroalbuminsynthese im Plasma der Patienten im septischen Schock. Die Syntheserate bei der septischen Gruppe lag um ca. 50 % unter der der beiden Kontrollgruppen I und II. Der Mann-Whitney-U-Test wies hier eine statistische Signifikanz der septischen Gruppe zu beiden nicht-septischen Kontrollgruppen auf.

Bei der Betrachtung der septischen Subgruppen waren statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen sowohl zu den überlebenden septischen als auch zu den nicht überlebenden septischen Patienten erkennbar, deren Syntheseraten deutlich reduziert waren. Die genauen Signifikanzwerte finden sich auch hier im Anhang der Arbeit (siehe Abschnitt 7.1.3).

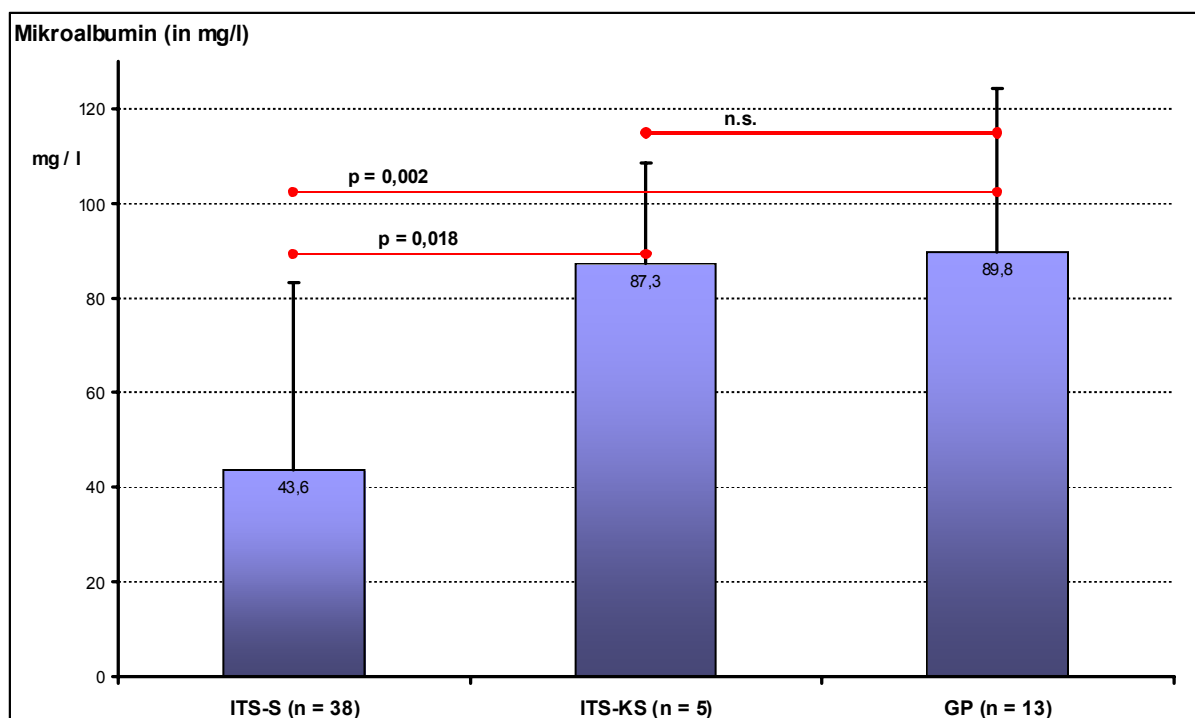


Abbildung 6: Alle Messergebnisse des Mikroalbumin-Tests (in mg/l) der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen (U-Test; n.s. = nicht signifikant)

Abbildung 7 zeigt den Verlauf der Mikroalbuminsynthese bei den septischen Patienten unter der EISS-Therapie. Zu jedem Messzeitpunkt lag die Syntheserate der überlebenden Patienten über der der nicht überlebenden Probanden. Nach dem ersten Behandlungszyklus ließen sich leichte Anstiege der Mikroalbuminsynthese feststellen, jedoch wiesen die nicht überlebenden Probanden unter dem zweiten Zyklus einen deutlichen Abfall der Rate auf und zeigten hier im Verlauf den größten Unterschied zur Subgruppe der überlebenden Patienten. Der Vergleich beider Subgruppen blieb dennoch sowohl zu den Messzeitpunkten im direkten Gruppenvergleich (mittels Mann-Whitney-U-Test) als auch im zeitlichen Verlauf (mittels Wilcoxon-Test) außerhalb der statistischen Signifikanz (siehe Abschnitt 7.1.3).

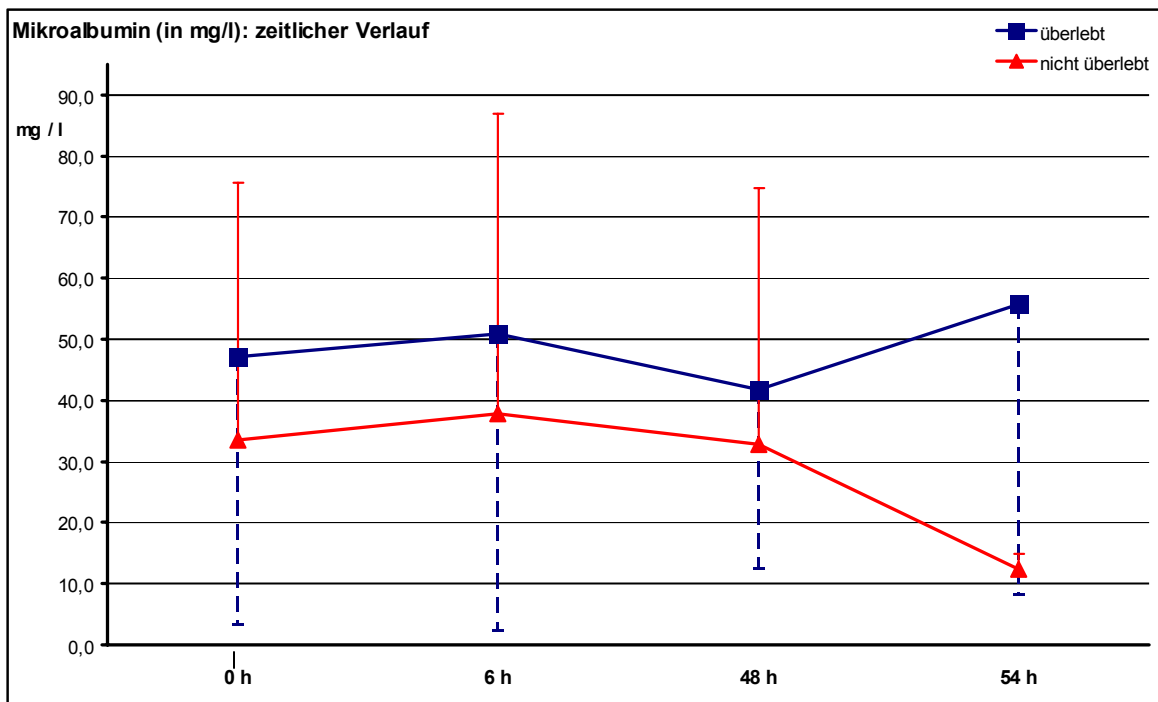


Abbildung 7: Mikroalbumin-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Subgruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf. Keine statistische Signifikanz zu den einzelnen Messzeitpunkten oder im Verlauf (U-Test und Wilcoxon-Test)

4.2.3 Bestimmung von Vitalität und Proliferation

4.2.3.1 XTT-Test

Die Messergebnisse des XTT-Tests (siehe Tabelle 7) wiesen lediglich bei den Patienten mit septischem Schock eine verminderte Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen auf, doch waren diese Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht statistisch signifikant. Der Vergleich der beiden Kontrollgruppen zu den septischen Subgruppen spiegelte diese Ergebnisse wider.

Auffällig war bei Betrachtung der Subgruppen, dass die Aktivität der überlebenden septischen Probanden auf einem niedrigeren Niveau als die der nicht überlebenden septischen Probanden lag. Auch hier erwiesen sich jedoch die im Mann-Whitney-U-Test ermittelten Unterschiede als statistisch nicht signifikant. Die genauen Signifikanzwerte finden sich auch hier im Anhang der Arbeit (siehe Abschnitt 7.1.3).

Tabelle 7: Alle Messergebnisse des XTT-Tests der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen

XTT (Extinktion/well)	ITS-S gesamt (n = 39)	ITS-KS (n = 5)	GP (n = 13)
Mittelwert	1,59	1,79	1,77
Standard-Abweichung	± 0,47	± 0,14	± 0,37

Der in Tabelle 8 dargestellte Verlauf der Messergebnisse des XTT-Tests unter der Behandlung mit dem extrakorporalen Immununterstützungssystem spiegelt die Trendergebnisse und Aussagen der Tabelle 7 für die septische Gruppe wider (siehe oben).

Bei Betrachtung der ITS-S-Gruppe war zwar zwischen den beiden EISS-Behandlungszyklen (der Zeitraum 6 h bis 48 h) ein Anstieg der gemessenen XTT-Werte zu erkennen, im gesamten Beobachtungszeitraum über 54 Stunden entsprach der erhobene Endpunktwert jedoch annähernd dem des Ausgangswertes. Auffällig waren hier die Ergebnisse der septischen Subgruppen, die einen

scherenartigen Verlauf nahmen. Die überlebenden septischen Probanden zeigten zum Studienbeginn im Vergleich zu den nicht überlebenden Probanden deutlich niedrigere XTT-Werte. Im zeitlichen Verlauf über 54 Stunden und zweimaliger EISS-Behandlung war eine Steigerung der gemessenen Werte um ca. 17 % zum Ausgangsbefund (Zeitpunkt 0 h) festzustellen, wobei der größte Anstieg der gemessenen Werte zwischen den beiden EISS-Behandlungszyklen lag. Dagegen zeigte sich bei den nicht überlebenden Probanden ein gegenläufig scherenartiger Verlauf. Ausgehend von einem hohen gemessenen XTT-Wert nahm dieser während des 54-stündigen Beobachtungszeitraumes kontinuierlich um ca. 30 % ab. Im Gegensatz zur ITS-S/ü-Gruppe traten hier die größten Abfälle der gemessenen XTT-Werte nicht zwischen, sondern während der sechsstündigen EISS-Behandlungszyklen auf. Zwischen der ersten und zweiten EISS-Behandlung hielten sich die gemessenen XTT-Werte auf einem annähernd stationären Niveau. Der Vergleich beider Subgruppen blieb sowohl im direkten Gruppenvergleich zu jedem Messzeitpunkt (mittels Mann-Whitney-U-Test) als auch im zeitlichen Verlauf zu den weiteren Messzeitpunkten (mittels Wilcoxon-Test) außerhalb der statistischen Signifikanz.

Tabelle 8: XTT-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Subgruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf

XTT (Extinktion/well)	0 h	6 h	48 h	54 h
ITS-S/ü (n = 7)	1,39 ± 0,58	1,46 ± 0,49	1,70 ± 0,56	1,63 ± 0,29
ITS-S/nü (n = 3)	1,92 ± 0,49	1,73 ± 0,55	1,71 ± 0,52	1,34 ± 0,15

4.2.3.2 LDH-Freisetzung

Wie in Abbildung 8 dargestellt, wies der Vergleich der Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Der gemessene LDH-Gehalt im Plasma zeigte bei der septischen Gruppe im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen jedoch deutlich geringere Werte, wobei lediglich zur gesunden Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied vorlag.

Daneben ergaben sich im Vergleich der gesunden Kontrollgruppe zu den septischen Subgruppen (ITS-S/ü und ITS-S/nü) statistisch signifikant niedrigere Werte. Im Plasma der nicht überlebenden Probanden wurden die niedrigsten Werte gemessen, sie lagen um ca. 40 % niedriger als der LDH-Gehalt der überlebenden septischen Probanden.

Der direkte Vergleich der septischen überlebenden und nicht überlebenden Probanden ergab ebenfalls signifikant niedrigere Werte bei den verstorbenen Probanden. Die genauen Signifikanzwerte finden sich hier im Anhang der Arbeit (siehe Abschnitt 7.1.3).

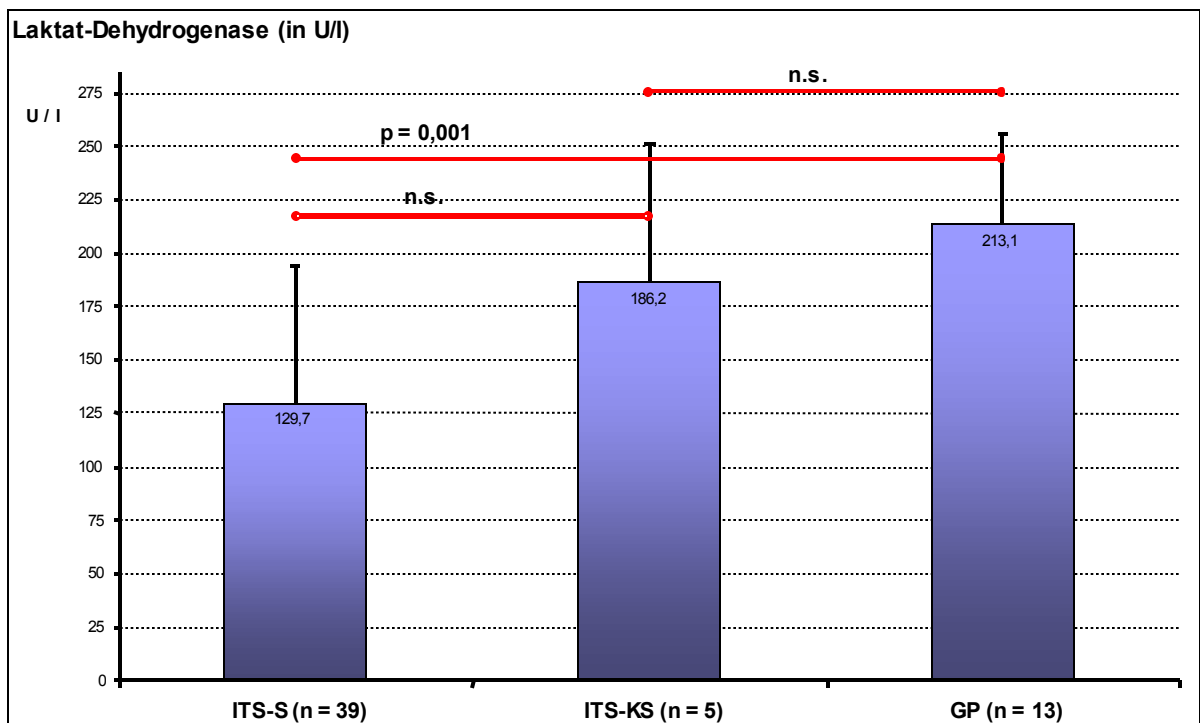


Abbildung 8: Alle Messergebnisse des LDH-Tests (in U/l) der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen (U-Test; n.s. = nicht signifikant)

Abbildung 9 zeigt die Verlaufsdarstellung der LDH-Messergebnisse. Bei der Gesamtbetrachtung der septischen Gruppe fiel der LDH-Gehalt über den Beobachtungszeitraum von 54 Stunden auf etwa 75 % des Ausgangswertes ab, wobei erst unter dem zweiten Behandlungszyklus der deutliche Abfall erkennbar wurde. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes lagen die LDH-Werte der nicht überlebenden septischen Probanden deutlich unter denen der überlebenden sep-

tischen Patienten, wobei die Abfälle der gemessenen Werte bei Betrachtung der Subgruppen sowohl unter als auch zwischen den beiden EISS-Behandlungen auftraten.

Die größte Differenz beider Subgruppen war nach dem ersten Behandlungszyklus erkennbar. Nur während dieses ersten Behandlungszyklus kam es bei den überlebenden septischen Probanden zu einem Anstieg der gemessenen LDH-Werte, wohingegen die nicht überlebenden septischen Studienteilnehmer den einzigen Anstieg der Enzym-Werte zwischen beiden Behandlungszyklen aufwiesen. Der zeitliche Vergleich der Ausgangswerte zu den Endpunktbestimmungen (nach 54 h) zeigte bei den überlebenden Probanden einen Abfall des LDH-Wertes um knapp 22 %, bei den nicht überlebenden Probanden einen Abfall um ca. 37 %. Jedoch blieb auch hier der Vergleich beider Subgruppen im direkten Gruppenvergleich zu jedem Messzeitpunkt und auch zu den Messzeitpunkten im zeitlichen Verlauf außerhalb einer statistischen Signifikanz (siehe Abschnitt 7.1.3).

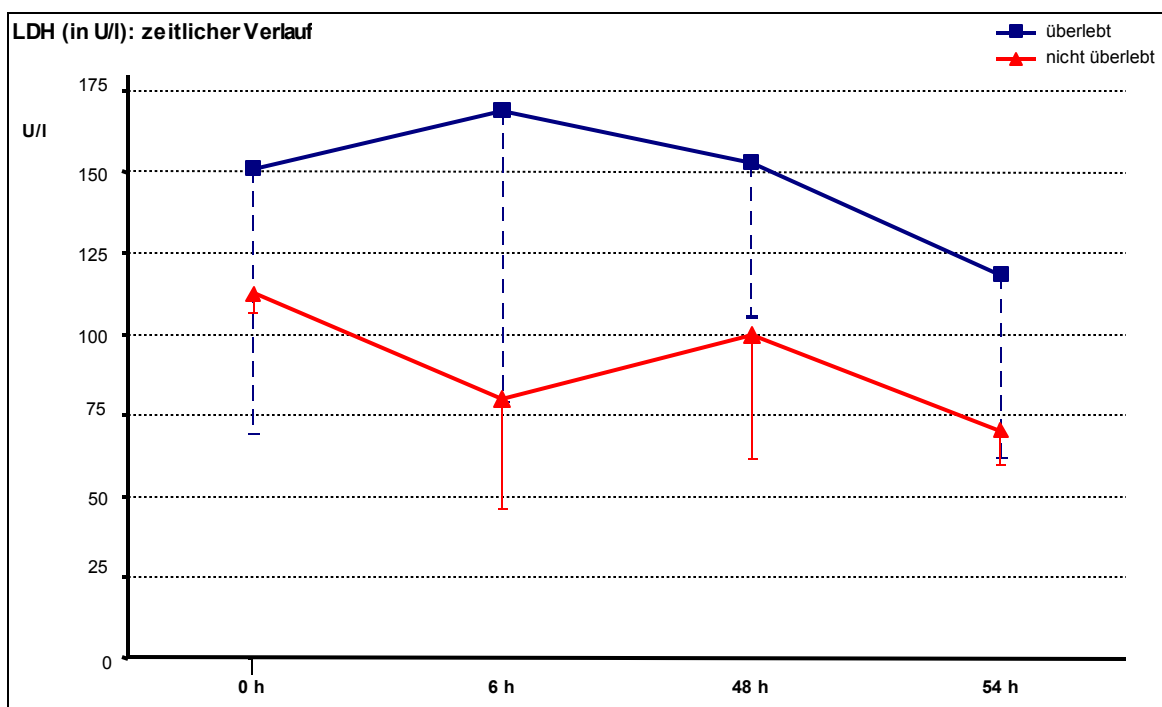


Abbildung 9: LDH-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Subgruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf. Keine statistische Signifikanz zu den einzelnen Messzeitpunkten oder im Verlauf (U-Test und Wilcoxon-Test)

4.2.3.3 Life/Dead-Färbung: Bilder

Nach Inkubation der HepG2/C3A-Sensorzellen mit den verschiedenen Testplasmen der beobachteten Studienteilnehmer und nachfolgender Durchführung der Live/Dead-Färbung wurden die Hepatozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie betrachtet. Nachfolgend werden exemplarisch aus jeder Studienteilnehmergruppe die Ergebnisse dieser Färbung photographisch abgebildet. Hier kennzeichnet jeder leuchtend grüne Punkt eine vitale Zelle, wohingegen in den Bereichen mit gehäuft roten Punkten abgestorbene bzw. absterbende Zellen sichtbar sind.

In Abbildung 10 sind die Sensorzellen nach Inkubation mit dem Plasma eines Probanden der septischen Testgruppe vor der ersten Behandlung mit dem EISS-System zu sehen. Im Zellrasen erscheinen die vitalen HepG2/C3A-Sensorzellen als flache, polygonal wachsende Zellen. Sie wachsen größtenteils, aber nicht ausschließlich als Monolayer. Einzelne, losgelöste vitale Zellen weisen morphologische Veränderungen auf, wirken spindelförmig aufgebläht und fibroblastenartig. Die vergleichende Betrachtung der fluoreszierenden Zellen nach der Live/Dead-Färbung zeigt eine reduzierte Vitalität der Sensorzellen, deren typische hepatozelluläre Morphologie aufgehoben und durch pyknotische Zellschrumpfung und Ablösung vom Substrat bzw. aus dem Zellverband gekennzeichnet ist.

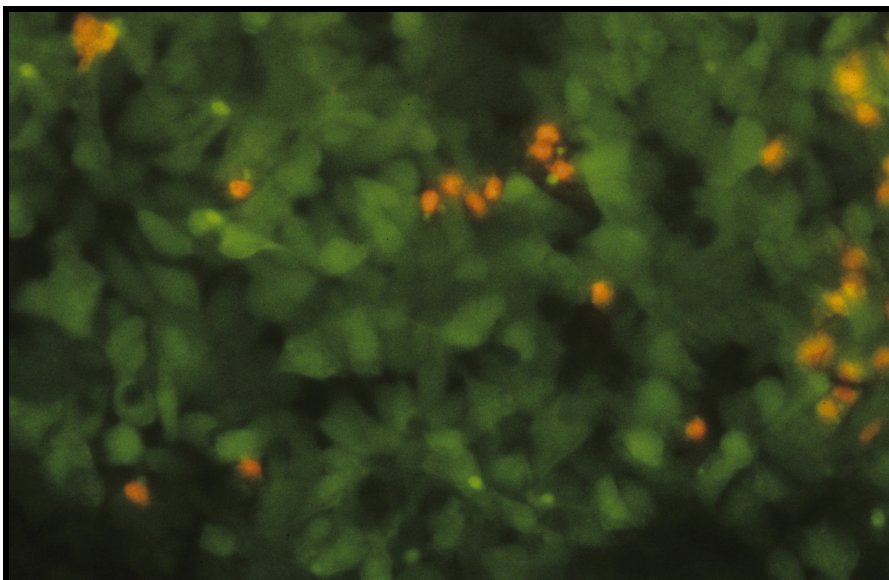


Abbildung 10: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der septischen Testgruppe vor einer EISS-Behandlung

Dagegen zeigt Abbildung 11 die HepG2/C3A-Zellen des vorgestellten Biosensors nach Plasmainkubation eines Probanden der septischen Gruppe nach der ersten Behandlung mit dem EISS-System.

Die grün-fluoreszierenden, vitalen HepG2/C3A-Zellen scheinen weiter aufgebläht und vakuolisiert. Die typische, polygonale Form ist aufgelöst und die Zellen werden zunehmend sphäroidförmig. Es zeigt sich die Zunahme rot-fluoreszierender Hepatozyten-Sensorzellen als Zeichen einer deutlich reduzierten Vitalität dieser Indikatorzellen, deren zelltypisches Verhalten und morphologische Veränderungen bereits in Abbildung 10 zu sehen ist.

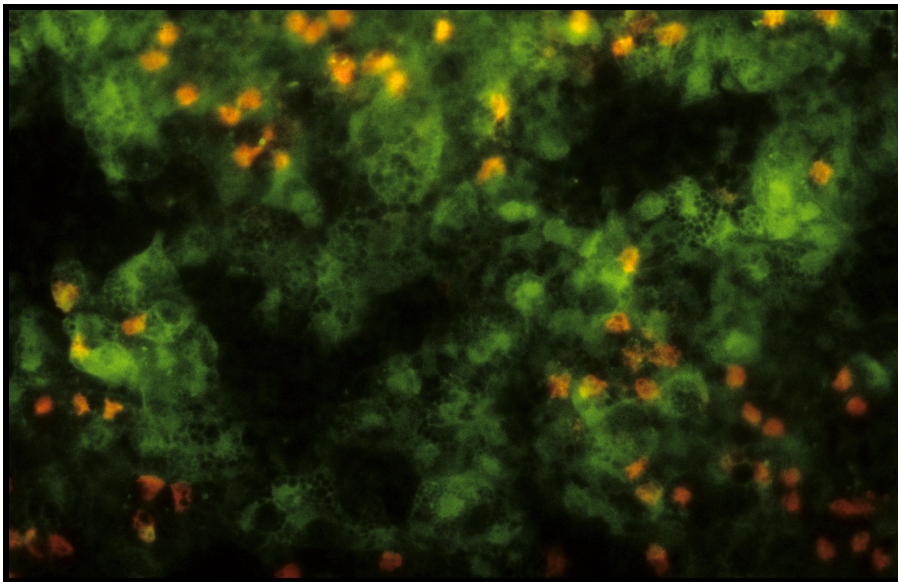


Abbildung 11: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der septischen Testgruppe nach einer EISS-Behandlung

In Abbildung 12 wird ein deutliches Überwiegen von grün-fluoreszierenden, vitalen Hepatozyten eines Probanden der nicht-septischen Kontrollgruppe I deutlich. Zellmorphologisch gleichen die Sensorzellen denen der Kontrollgruppe II (siehe Abbildung 13).

Nur sehr vereinzelt sind hier rot-fluoreszierende (also abgestorbene bzw. absterbende) Zellen sichtbar, deren typischen Veränderungen denen in Abbildung 10 und 11 gleichen.

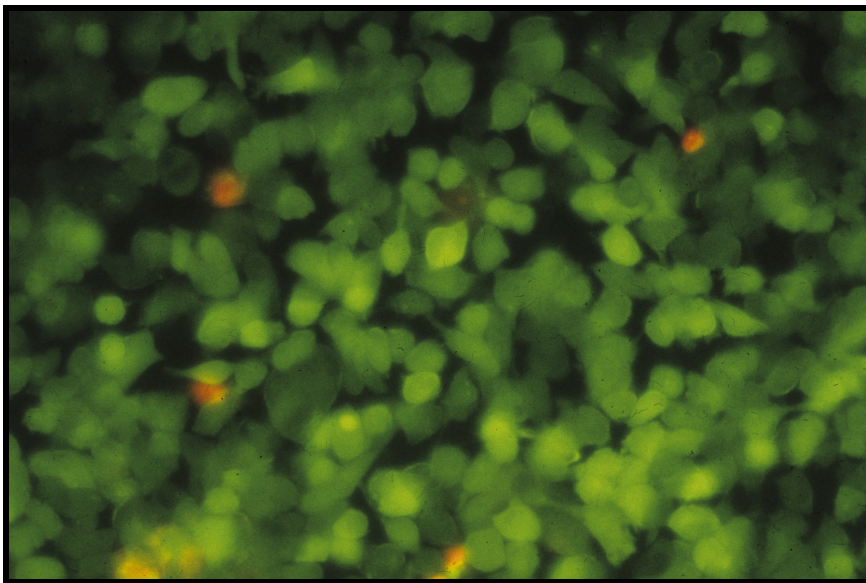


Abbildung 12: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der nicht-septischen Kontrollgruppe I

In Abbildung 13 werden die HepG2/C3A-Sensorzellen nach der Inkubation mit dem Plasma eines Patienten der gesunden Kontrollgruppe II gezeigt.

Die morphologische Gestalt der HepG2/C3A-Sensorzellen ist der von humanen Hepatozyten in Kultur sehr ähnlich. Im Zellrasen zeigen die Sensorzellen ein epitheloides Wachstum, das am Rand unregelmäßiger und aufgebläht erscheint. In den Zellhaufen sind die interzellulären Verbindungen sehr intensiv. Nach der Live/Dead-Färbung überwiegen die grün-fluoreszierenden, vitalen Hepatozyten. Absterbende oder avitale Zellen sind nur sehr vereinzelt zu finden und sind neben der rot-fluoreszierende Anfärbbarkeit durch die Auflösung der typischen Zellmorphologie und Loslösung aus dem Zellverband gekennzeichnet.

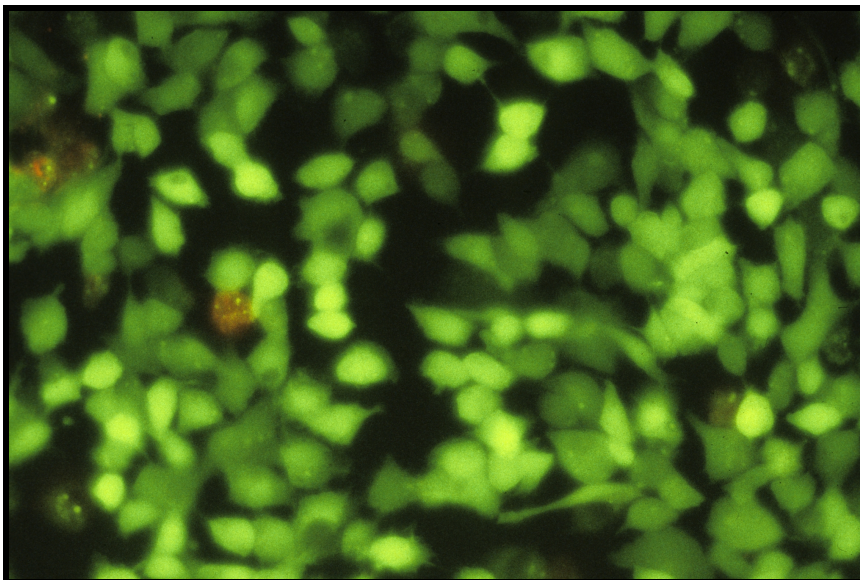


Abbildung 13: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der gesunden Kontrollgruppe II

4.3 Korrelationen zwischen unterschiedlichen Parametern

Trotz der bei dieser vorgestellten Pilotstudie relativ geringen Fallzahl ($n = 28$) wurden die Korrelationen zwischen den laborchemischen Parametern sowie den erhobenen Scores mit den Ergebnissen des Hepatozyten-Biosensors ermittelt. Bei nicht vorhandener Normalverteilung der Merkmale wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman [119] bestimmt. Die Zusammenhänge werden durch den Korrelationskoeffizienten ρ (= rho) angegeben, der sowohl positive als auch negative Werte einnehmen kann und somit eine positive oder negative Beziehung bzw. einen Zusammenhang zwischen zwei beobachteten Merkmalen beschreibt. Die Quantifizierung der Stärke eines Zusammenhanges wird üblicherweise nach folgenden Abstufungen interpretiert:

Tabelle 10: Interpretation des Korrelationskoeffizienten Rho (ρ)

Werte des Korrelationskoeffizienten ρ :	Interpretation:
$0,0 < \rho \leq 0,2$	sehr geringe Korrelation
$0,2 < \rho \leq 0,5$	geringe Korrelation
$0,5 < \rho \leq 0,7$	mittlere Korrelation
$0,7 < \rho \leq 0,9$	hohe Korrelation
$0,9 < \rho \leq 1,0$	sehr hohe Korrelation

Um zu zeigen, dass ein Zusammenhang nicht zufällig, sondern zu verallgemeinern ist, wurden darüber hinaus die Signifikanzen der ermittelten Korrelationen bestimmt.

Ein Zusammenhang der beiden jeweils beobachteten Merkmale wurde graphisch in einem Diagramm dargestellt, wobei mit Hilfe eines Scatterplots (Punktwolke) die Stärke des Zusammenhanges verdeutlicht wird.

Je stärker der Zusammenhang (bzw. die Korrelation) zwischen den betrachteten Merkmalen ist, desto schmaler erstreckt sich die Punktwolke entlang einer gedachten Regressionslinie. So liegen bei einer starken Korrelation die meisten Punkte sehr nahe an dieser Linie, wohingegen eine unstrukturierte Punktwolke ein Hinweis auf einen fehlenden Zusammenhang ist.

Mögliche Zusammenhänge wurden einerseits zwischen ausgewählten laborchemisch bestimmten klinischen Parametern (ALAT, ASAT, Bilirubin, CrP) sowie den erhobenen Scores (APACHE II, SOFA, SAPS II) der Studienteilnehmer und andererseits zwischen den gewonnenen Daten des Hepatozyten-Biosensors (Ergebnisse des Ethoxyresorufin-Tests, der Mikroalbuminbestimmung, des XTT-Tests und der LDH-Freisetzung) statistisch untersucht.

In der Testgruppe der septischen Studienteilnehmer wurden sowohl die Laborparameter als auch die erhobenen Scores (jeweils bestimmt zum Studienbeginn und am dritten Studientag) in Bezug zu den Werten des Hepatozyten-Biosensors an den vier Messzeitpunkten (0 h, 6 h, 48 h und 54 h) gesetzt.

Es zeigten sich vereinzelt signifikante mittlere bis hohe Korrelationen zwischen den erhobenen Scores (besonders bei dem APACHE II und dem SOFA-Score) zum Ethoxyresorufin-Test sowie der LDH-Freisetzung (hier immer in negativer Korrelation), sehr vereinzelt zeigten sich signifikante mittlere bis hohe Korrelationen auch zwischen dem SAPS II-Score und der LDH-Freisetzung (auch hier in negativer Korrelation) sowie dem XTT-Test.

Festzustellen war, dass die Serum-Bilirubinwerten weder zu den Scores, hier im Besonderen zu den Bilirubin-basierten SOFA- und SAPS II-Scores, noch zu den gewonnenen Daten des Biosensors signifikant höhergradig korrelierten.

Bei den nicht-septischen Kontrollprobanden war eine sehr hohe (positive) Korrelation mit einem p -Wert $> 0,9$ bei einer statistischen Signifikanz $p \leq 0,05$ lediglich zwischen den CrP-Werten und den SAPS II-Werten sowie eine sehr hohe (negative) Korrelation zwischen den SOFA-Score-Werten und den XTT-Daten des Biosensors festzustellen. Die Vergleiche der laborchemischen Parameter mit denen des Biosensors zeigten teilweise mittlere bis hohe Korrelationen. Gleiches galt für den Vergleich der Scores sowohl zu den Daten des Biosensors als auch zu den Serum-Bilirubinwerten, die sich jedoch allesamt statistisch als nicht signifikant darstellten.

In der Kontrollgruppe der gesunden Probanden zeigte sich eine signifikante mittlere (negative) Korrelation lediglich im Vergleich zwischen den bestimmten Serum-Bilirubinwerten und den LDH-Daten des Biosensors.

Die genauen Korrelationen mit Signifikanzen befinden sich tabellarisch im Anhang dieser Arbeit (siehe Abschnitt 7.1.3).

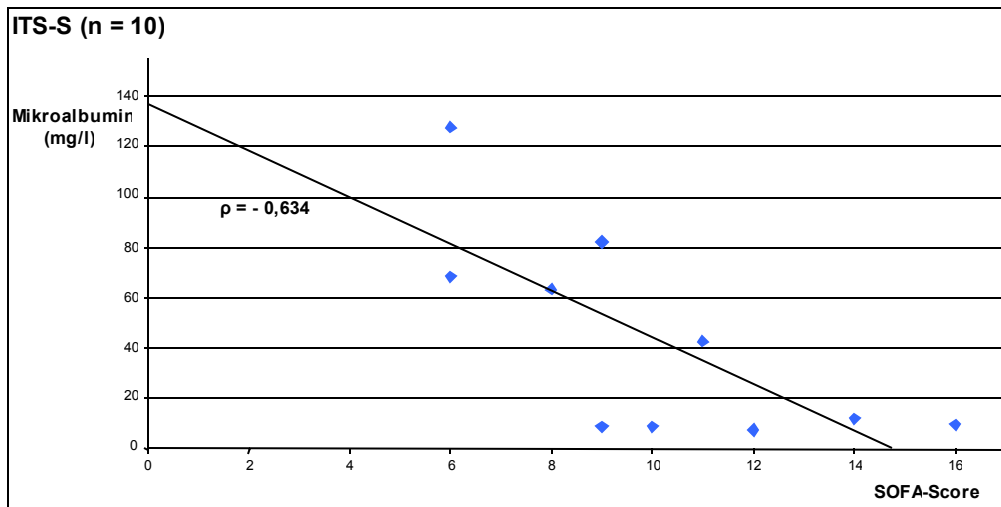


Abbildung 14: Signifikante negative mittlere Korrelation zwischen den SOFA-Score- und Mikroalbumin-Werten des Biosensors bei der septischen Testgruppe

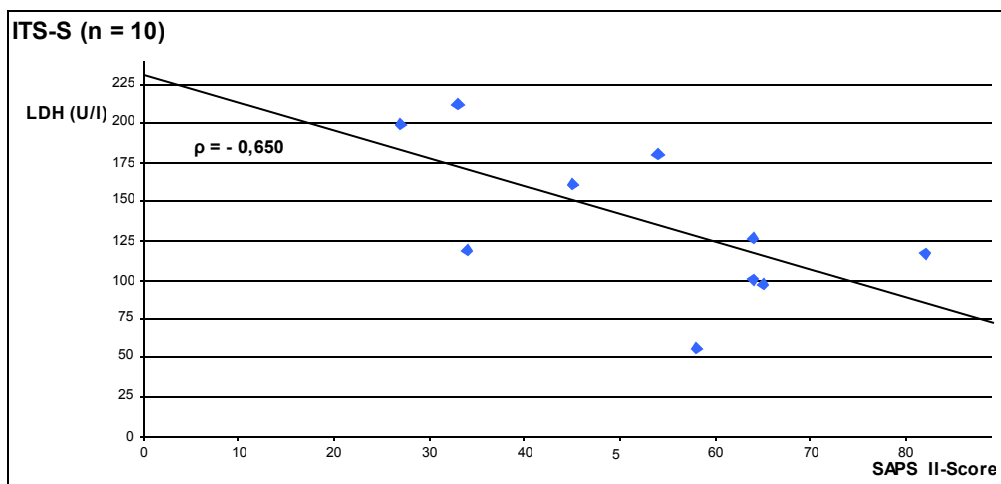


Abbildung 15: Signifikante negative mittlere Korrelation zwischen den SAPS II-Score- und LDH-Werten des Biosensors bei der septischen Testgruppe

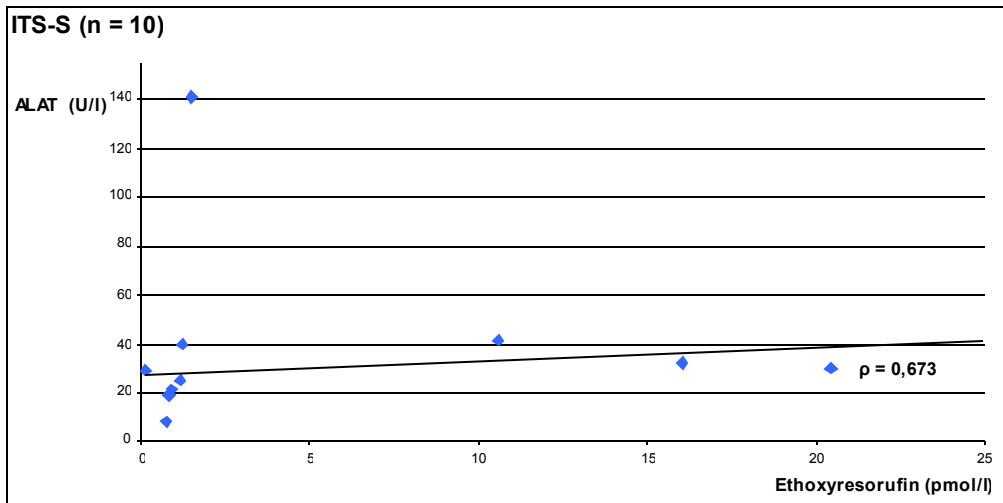


Abbildung 16: Signifikante mittlere Korrelation zwischen den Serum-ALAT- und Ethoxyresorufin-Werten des Biosensors bei der septischen Testgruppe

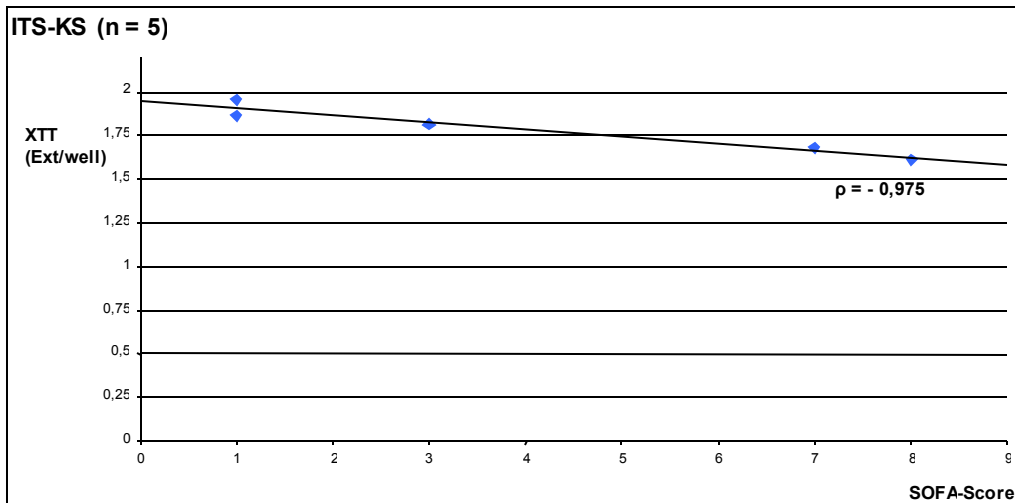


Abbildung 17: Signifikante negative sehr hohe Korrelation zwischen den SOFA-Score- und XTT-Werten des Biosensors bei der nicht-septischen Kontrollgruppe I

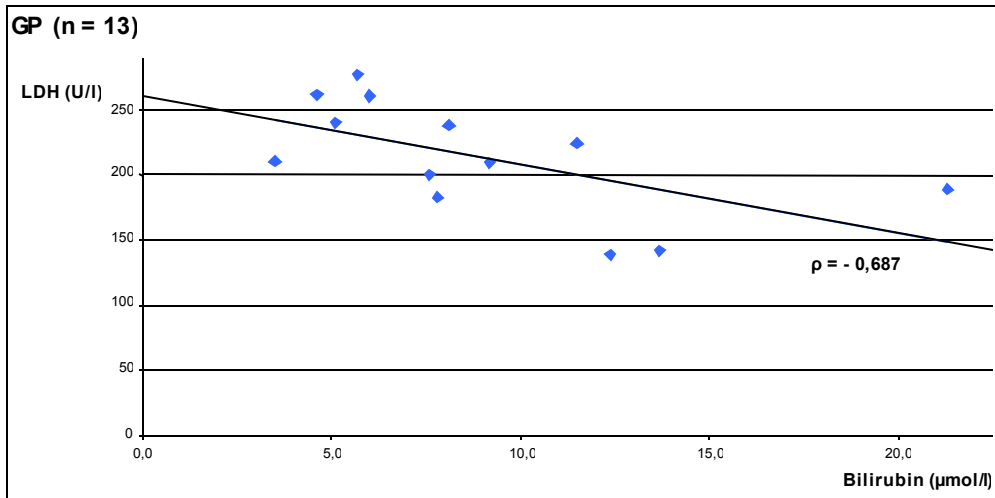


Abbildung 18: Signifikante negative mittlere Korrelation zwischen den Serum-Bilirubin- und LDH-Werten des Biosensors bei der gesunden Kontrollgruppe II

5. Diskussion

Trotz deutlicher Fortschritte der allgemeinen Sepsistherapie und besserer Möglichkeiten beim Ersatz einzelner Organfunktionen versterben dennoch ca. 30 % der Sepsispatienten im Verlauf ihrer Erkrankung [48, 49, 99, 120]. Die Leberfunktion ist hierbei bereits sehr früh nach Einsetzen der Sepsis eingeschränkt, wobei das Vorkommen der Leberfunktionsstörung in einer 2004 veröffentlichten Studie bei Patienten mit schwerer Sepsis mit 19 bis 22 % angegeben wird [28].

Das Auftreten und Ausmaß der Leberdysfunktion ist im Rahmen einer schweren Sepsis und des Multiorganversagens von relevanter Bedeutung und entscheidend mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert [3, 14]. Die Ermittlung einer eingeschränkten oder gestörten Leberfunktion zum frühestmöglichen Zeitpunkt ist von großer Bedeutung, um entsprechend frühzeitige weiterführende diagnostische und therapeutische Interventionen eines Leberversagens einleiten zu können. Derzeit verwendete statische diagnostische Verfahren wie die Bestimmungen von ALAT, ASAT, AP, LDH oder Bilirubin erlauben lediglich Momentaufnahmen zur Beurteilung der Leberfunktion. Diese haben außerdem den Nachteil, dass sie zeitlich verzögert, teils unspezifisch bzw. erst bei fortgeschrittenem Leberversagen deutlich pathologische Werte zeigen und somit zur Früherkennung eines Leberversagens weniger geeignet sind. So wird beispielsweise ein Anstieg des Bilirubins im Rahmen einer schweren Sepsis im Durchschnitt erst 7 bis 20 Tage nach den ersten Zeichen der Infektion beobachtet [121, 122, 123, 124].

Gleiches gilt für Bilirubin-assoziierte Prognosescores wie der SAPS II oder SOFA-Score, die ein Leberversagen erst 48 bis 72 Stunden nach der Organdysfunktion erfassen [2].

Besser geeignet sind hier dynamische Parameter wie die Messung der Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate (Indocyanin Green-Plasma-Disappearance Rate; ICG-PDR) oder der Monoethylglycinoxylidid-Test (MEGX-Test). Beides sind Leberfunktionstests, die nach Applikation einer Indikatorsubstanz deren Metabolisierung oder Exkretion messen und so eine Aussage über die aktuelle Situation von Leberperfusion und -funktion erlauben sollen.

So wird beim LiMON-System (Liver Monitoring; Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland) nach intravenöser Gabe des Farbstoffes Indocyaningrün über ein externes transkutanes Monitoring-Gerät nicht-invasiv und pulsdensitometrisch bettseitig die Plasmaverschwinderate der Indikatorsubstanz gemessen und kann als mögliches Monitoring der Splanchnikusperfusion für die Therapie des Leberversagens angesehen werden [15]. Zur Ermittlung dieser Perfusion (der Splanchnikusblutfluss ist als Summe der Blutflüsse über die Arteria hepatica und der Vena portae definiert und entspricht somit der hepatovenösen Perfusion) und der Leberfunktion befindet sich das LiMON-System derzeit im fortgeschrittenen klinischen Einsatz. Eine 2001 veröffentlichte prospektive Studie an Patienten im septischen Schock zeigt eine höhere Sterblichkeit für diejenigen Patienten, deren ICG-PDR sich während der ersten 120 Stunden der Intensivtherapie nicht verbesserte [14].

Aus technischen Gründen ist es jedoch insbesondere bei hoch septischen, katecholaminpflichtigen und zentralisierten Patienten aufgrund peripherer Perfusionsstörungen und damit verbundener schlechter Signalqualität schwierig, eine korrekte Messung mit diesem System (Pulsdensitometrie über Fingerclip) durchzuführen. Außerdem sind laut Herstellerangabe sehr seltene urtikarielle aber auch anaphylaktische Reaktionen beobachtet worden. Aufgrund des Jodgehaltes der Injektionslösung sind toxische Nebenwirkungen bekannt. Daneben sind Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln beschrieben, die das Ergebnis verfälschen können [125].

Die ICG-Elimination ist von der Leberdurchblutung, Leberzellfunktion und biliärer Exkretion abhängig. Ein wesentlicher Nachteil besteht hier darin, dass eine Differenzierung zwischen der Leberdurchblutung und -zellfunktion letztendlich nicht möglich ist. Bezüglich der Leberperfusion bietet das System keine Unterscheidung zwischen dem portalvenösen Einstrom in die Leber (physiologisch ca. 70 bis 80 %) und dem leberarteriellen Blutfluss (physiologisch ca. 20 bis 30 %), so dass partielle Ischämien oder hepatozelluläre Funktionsstörungen bei einer Leberdysfunktion mit dieser Methode nicht ursächlich differenziert werden können [126].

Außerdem weist das Ausmaß der hepatischen Extraktion nicht nur intraindividuell große Unterschiede auf, sondern wird auch durch therapeutische Interventionen oder durch so unterschiedliche Faktoren wie Endotoxin, ATP-Gehalt der Hepatozyten, Hämatokrit und Proteingehalt des Serums erheblich beeinflusst [127, 128, 129, 130]. Dementsprechend kann diese periphere pulsdensitometrische ICG-Clearance nicht als Maß für die splanchnische Perfusion angesehen werden [126]. Stehr et al. stellen 2005 die generelle Bedeutung der ICG-PDR im Rahmen der Hyperinflammation infrage. Im tierexperimentellen Modell der Sepsis konnte ein Zusammenhang zur Leberdurchblutung (gemessen mit einem Lebervenenkatheter) nachgewiesen werden. Allerdings wurde die signifikante Abnahme der biliären ICG-Exkretion durch die ICG-PDR, die während des Untersuchungszeitraums unverändert blieb, nicht erfasst. Einen Erklärungsansatz sehen die Autoren in einer möglichen intrazellulären hepatischen Speicherung des Farbstoffes und merken an, dass die ICG-PDR eher ein Marker der Leberdurchblutung als der exkretorischen Funktion zu sein scheint [131]. Kapral et al. sprechen darüber hinaus von der Möglichkeit, dass diese ICG-Ausscheidungsveränderung auch nur der allgemeine Ausdruck der Menge an freigesetzten Zytokinen in der Leber sein könnte, da diese verantwortlich für Veränderungen im Transportmechanismus von ICG sind [132].

Auch bei der Durchführung des MEGX-Tests sind nach intravenöser Applikation von Lidocain und dessen Abbau zu Monoethylglycinxylylidid allergische Reaktionen, vor allem aber arrhythmogene und prokonvulsive Komplikationen durch die systemische Toxizität des Natriumkanalblockers bekannt. Lidocain unterliegt einem hohen First-Pass-Effekt. Die MEGX-Bildung ist abhängig von der Leberfunktion und vor allem von der Leberdurchblutung [133]. Auch hier besteht im Einzelfall keine Sicherheit, ob nun die Leberfunktion oder nicht etwa der Organblutfluss ursächlich für veränderte MEGX-Werte ist [134]. Der dynamische Funktionstest ist in seiner Anwendung somit sowohl aufgrund des sehr variablen Blutflusses als auch wegen der intrahepatischen Metabolismus-Kompartimentierung limitiert [135, 136]. Eine im Jahr 2000 veröffentlichte Studie von Fukuda et al. erbrachte Hinweise auf eine verlängerte Halbwertszeit, eine geringere Lidocain-Clearance und niedrigere MEGX-Lidocain-Quotienten bei Über-Siebzigjährigen [137]. Auch

bei lebergesunden Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen, sind signifikant verringerte MEGX-Werte gegenüber dem Normalwert gemessen worden [138].

Demgegenüber weist der in dieser Promotion als Zytotoxizitätstest vorgestellte Biosensor durch die nicht notwendige systemische Applikation einer Indikatorsubstanz weder allergische oder anaphylaktische noch toxische Nebenwirkungen auf.

Sowohl die beschriebenen Biosensoren (Neuro- und Leukozyten-Biosensor; siehe Abschnitt 1.4) als auch extrakorporale bioartifizielle Leber- und Immun-Unterstützungssysteme (siehe Abschnitt 1.5) zeigen positive Ergebnisse bei diagnostischen und therapeutischen Ansätzen unter Verwendung von vitalen Zellen.

Die aufgeführten bioartifiziellen Organunterstützungsmethoden zeigen, dass schon seit langem theoretische und praktische Erfahrungen im therapeutischen Einsatz unter Verwendung von Hepatozyten bekannt sind, seien sie nun tierischer oder menschlicher Herkunft, primären Ursprungs oder aus einer Hybrid-Zelllinie stammend [83, 87, 89, 91, 94].

Aden et al. isolierten bereits 1979 die humane Zelllinie HepG2 aus der Leberbiopsie eines 15-jährigen Kindes, welches an einem primären hepatozellulären Karzinom erkrankt war [139].

HepG2/C3A ist eine humane Hepatoblastom-Zelllinie, die aus dieser etablierten Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 hervorgegangen ist. Subklonierungskriterien für die Generierung von HepG2/C3A waren eine starke Kontaktinhibition des Wachstums, eine hohe Produktionsrate für eine Reihe verschiedenster Proteine, sowie die Fähigkeit, in glucosedefizientem Medium zu wachsen. HepG2/C3A-Zellen sind gut differenziert. Sie besitzen viele phäno- und genotypische Eigenschaften der normalen Leberzellen und sind frei von viralen Sequenzen. Die Zelllinie besitzt noch viele Funktionen, die für normale humane Hepatozyten typisch sind. In Kultur sezernieren HepG2/C3A-Zellen wichtige Plasmaproteine. Zu den exprimierten Proteinen zählen α -Fetoprotein, Albumin, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin, Transferrin, α_1 -Antichymotrypsin, Haptoglobin, Coeruloplasmin, Plasminogen, Komplement C3 und C4, C3-Aktivator, Fibrinogen, saures α_1 -Glycoprotein, α_2 -HS-Glycoprotein, Apolipoproteine, Retinol-bindendes Protein und Erythropoetin. HepG2/C3A-Zellen besitzen die Fähigkeit, Glykogen zu bilden, wenn genügend

Glucose im Kulturmedium vorhanden ist, und sie produzieren Kollagen I, III und IV [140]. Die Zelllinie ist frei von Genen des Hepatitis-B-Virus (HBV) [141].

In der Wachstumsphase vor dem Konfluieren verhalten sich die HepG2/C3A-Zellen ähnlich dem sich regenerierendem Lebergewebe. Sie wachsen auf Substratoberflächen adhärent und epithelähnlich als Monolayer-Kultur. Die Verdopplungszeit liegt bei lediglich 24 Stunden. In diesem Zeitraum sezernieren die Zellen eine Reihe fetaler Proteine in das Medium, darunter α -Fetoprotein, Aldolase A und C sowie Pyruvatkinase K.

Sobald die Zellen das Stadium der Konfluenz erreichen, wird das weitere Wachstum durch eine ausgeprägte Kontaktinhibition limitiert. Die Häufigkeit der Zellteilungen verringert sich deutlich, so dass die Verdopplungszeit auf über 200 Stunden ansteigt und sich ein Gleichgewicht ausbildet. Es überwiegen nun HepG2/C3A-Zellen, die einen adulten Phänotyp darstellen. Dies wird auch an der Proteinproduktion deutlich: Die Bildung fetaler Proteine nimmt ab, stattdessen erfolgt eine vermehrte Synthese von Albumin, Aldolase B und Pyruvatkinase L. Neben der Proteinsynthese und deren Sekretion (Syntheseprodukte: siehe oben) sind HepG2/C3A-Zellen auch zur Harnstoffsynthese aus Laktat und Ammoniumchlorid in der Lage. Ferner können die HepG2/C3A-Zellen in glucosefreiem Medium kultiviert werden. Dies zeigt, dass die verwendete humane Hepatozytenlinie HepG2/C3A die Fähigkeit zur Gluconeogenese besitzt, welche eine der wichtigsten leberspezifischen Stoffwechselfunktionen darstellt.

Die Aktivität von humanem, fast ausschließlich in der Leber lokalisiertem Cytochrom P450 1A2, einem Enzym, das vor allem für den Arzneistoffmetabolismus in der Leber eine wichtige Funktion besitzt, zeigt bei HepG2/C3A-Zellen eine geringe Aktivität. Durch Induktion mit 3-Methylcholanthren (3-MCH) wiesen Donato et al. sowohl für Ratten- als auch für humane Hepatozyten eine Aktivitätssteigerung auf ein über 40-Faches im Vergleich zum Ausgangswert nach [108].

Daneben fanden Nyberg et al. zwar wesentlich geringere CYP 1A1- und 1A2-Aktivitäten in HepG2-Zellen als in primären Hepatozyten, allerdings wurde hier das Medium nur mit 5%igem anstatt mit 10%igem FKS versetzt [142]. Dieses im Vergleich niedrig konzentrierte Serum kann die CYP-Aktivität in HepG2-Zellen stark verringern [143].

Aufgrund der weitgehenden leberspezifischen Differenzierung der HepG2/C3A-Zelllinie wurden diese Zellen als Bestandteil eines künstlichen Leberunterstützungssystems zur Therapie des Leberversagens bereits erprobt (siehe Abschnitt 1.5) [83, 94].

Auch in pharmakologischen und/oder toxikologischen Studien stellen HepG2/C3A-Zellen eine etablierte und oft genutzte Zelllinie dar [82, 116].

Vergleichbare Untersuchungen zur Ermittlung der Leberfunktion auf zellulärer Ebene bei eingeschränkter bzw. gestörter Organfunktion, beruhend auf der Idee, dass jede Substanz in Abhängigkeit ihrer Konzentration und/oder Kombination mit anderen Substanzen toxische Einflüsse auf humane Zellen haben kann, sind bisher nicht bekannt.

Das in dieser Arbeit vorgestellte neue Testverfahren zum Monitoring der Leberfunktion basiert auf humanen Leberzellen (HepG2/C3A), die organspezifisch und sensibel für inflammatorische Reize sind. Nach Inkubation mit hinzugegebenem Patientenplasma wird in einem standardisierten Mikrotiter-Plattenassay dessen Zytotoxizität, also die Schädigung auf zellulärer Ebene, erfasst.

Die bestimmten Parameter umfassen den Aktivierungsgrad von CYP 1A2 der eingesetzten Hepatozyten über die Ethoxyresorufin-Fremdstoffmetabolisierung, die Funktionalität der Sensorzellen über die Messung der Albumin-Biosynthese, sowie die Vitalität und Proliferation der humanen Leberzellen durch den XTT-Test, die Messung der LDH-Freisetzung der eingesetzten Hepatozyten im Überstand und den Live/Dead-Test.

An der hier vorgestellten klinischen Studie wurden 28 freiwillige Probanden eingeschlossen. Der präsentierte Hepatozyten-Biosensor wurde an folgenden drei Testgruppen untersucht und verglichen: bei intensivpflichtigen Patienten mit septischem Schock, bei intensivpflichtigen Patienten ohne septisches Leiden und bei gesunden Freiwilligen.

Für die Analyse der CYP-Induktion wird häufig der Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Assay (EROD-Assay) benutzt. Es handelt sich um ein kinetisches Verfahren, bei dem das künstliche Substrat 7-Ethoxyresorufin durch das Enzym 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase in das messbare fluoreszierende Endprodukt Resorufin

deethyliert wird [144]. Die Enzymaktivität wird als EROD-Aktivität bezeichnet. Der EROD-Assay eignet sich speziell für die Darstellung der Stärke der CYP 1A-Induktion bzw. der davon abhängigen Monooxygenasen [145]. CYP-Enzyme sind im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien lokalisiert und dort an die lipidhaltigen Membranen gebunden. Die CYP-Superfamilie besteht aus mikrosomalen Hämoproteinen, die für den oxidativen, peroxidativen und reduktiven Stoffwechsel einer Reihe von endogenen und exogenen Stoffen eine zentrale Bedeutung haben. Die CYP-Enzyme oxygenieren das Substrat. Damit vermindern sie die Lipidlöslichkeit dieses Substrates und verbessern so seine Elimination. Gleichzeitig findet eine Reduktion von Sauerstoff statt. Aufgrund dieser doppelten Funktion (Oxidation des Substrats und Reduktion von Sauerstoff) werden sie als mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet.

Besondere Bedeutung besitzen diese Enzyme für den Metabolismus bzw. Abbau von Fremdstoffen (Pharmaka sowie Xenobiotika wie Umwelt- und Nahrungsgifte). Sie sind aber auch an der Biosynthese von Steroiden, Prostaglandinen und Retinoiden beteiligt. CYP 1A1 ist vor allem in extrahepatischem Gewebe lokalisiert, die Präsenz von CYP 1A2 scheint beim Menschen organspezifisch exprimiert beinahe ausschließlich auf die Leber beschränkt zu sein und macht dort etwa 18 % des gesamten Gehaltes an Cytochromen aus [146, 147]. Seine Expression ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem von Geschlecht, Rasse, genetischen Polymorphismen und der Exposition gegenüber Induktoren, so dass es große interindividuelle Unterschiede gibt.

In dem hier vorgestellten Zytotoxizitätstest zeigen sich nach Inkubation mit den verschiedenen Probandenplasmen deutliche Unterschiede in der Endproduktsmessung von Ethoxyresorufin und damit der CYP 1A-Aktivität in den Sensorzellen. Signifikant geringere Mengen an Ethoxyresorufin sind bei der septischen Gruppe im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen festzustellen, die umso deutlicher bei den nicht überlebenden septischen Patienten im Vergleich zu den überlebenden septischen Probanden auftreten. Diese weisen eine entsprechend deutliche Aktivitätseinschränkungen von CYP-Isoenzym 1A2 durch den zytotoxischen Effekt des septischen Plasmas hin. Bei der fast ausschließlichen Lokalisation dieses Cytochroms in der Leber mit Einschränkung des Fremdstoffmetabolismus beispiels-

weise für Arzneimittel oder auch Umwelt- und Nahrungsgifte ist von einer speziellen Organschädigung auszugehen.

Wegweisend für die Verwendung von CYP als Biomarker für die Umweltüberwachung waren die Arbeiten von Payne und Penrose, die an Fischen die Enzyminduktion durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe nachgewiesen haben [148, 149]. Neben der Induktion mit gesteigerten Aktivitäten kann jedoch auch eine Hemmung des CYP durch verschiedene Xenobiotika beobachtet werden. Diese kann auf völlig verschiedenen Mechanismen beruhen, wie etwa der Hemmung der Enzymsynthese, der Herstellung veränderter CYP mit geringerer Aktivität oder auch der kompetitiven oder irreversiblen Hemmung der CYP selbst [150]. Im Rahmen zytotoxikologischer Untersuchungen und Studien wurde beispielsweise bereits 1994 von Schmitz ein Abfall der EROD-Aktivität für polychlorierte Biphenyle (PCB) in primären Rattenhepatozyten beschrieben [151]. Eine dämpfende Wirkung des Schwermetalls Cadmium auf die EROD-Aktivität durch Feldbeobachtungen in vivo an Flundern wurde von Hylland et al. bestätigt [152]. Daneben bilden einige Xenobiotika, die über eine Nitrogruppe oder ein reaktives Kohlenstoffatom verfügen, nach metabolischer Aktivierung inaktive Komplexe mit CYP, so dass keine weitere katalytische Aktivität mehr besteht und somit zytotoxische Effekte erkennbar sind [150].

Albumine sind gut wasserlösliche globuläre Proteine und enthalten einen Überschuss an sauren Aminosäuren. Sie bestehen aus etwa 580 Aminosäuren und haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 66 000 Dalton. Albumine bilden ca. 60 % des Gesamteiweißes im Blutplasma und dienen vor allem zur Regelung des intravasalen kolloidosmotischen Drucks. Etwa das Zehnfache der täglichen synthetisierten Menge gelangt vom intravaskulären in den interstitiellen Raum und wird über das Lymphsystem wieder zurückgeführt. Für hydrophobe Stoffe (wie etwa freie Fettsäuren, Bilirubin, Hormone oder Spurenelemente und auch für verschiedene Arzneimittel) dienen sie als Transportproteine. Substanzen mit toxischer Wirkung können die Transportfähigkeit der Albumine durch die Bindung an diese verringern. Außerdem stellen Albumine eine Aminosäure-Reserve für den Körper dar. Sie tragen aufgrund ihrer ampholytischen Eigenschaften auch zur Pufferkapazität des Blutes bei, sie können Wasserstoffionen sowohl

aufnehmen als auch abgeben. Die Albuminsynthese findet ausschließlich in der Leber und dort in den Hepatozyten statt und wird von Insulin und Glucokortikoiden sowie anderen Hormonen beeinflusst.

Die tägliche Syntheserate eines Erwachsenen beträgt 150 bis 250 mg/kg Körpergewicht, dafür werden etwa 12 bis 20 % der Proteinsynthesekapazität der Leber benötigt [153]. Aus diesem Grund gilt die Albuminsynthese als wichtiger Parameter für die Funktion der Leber. Laut Nussler et al. stellt vor allem die Sekretion von Albumin ein Zeichen für einen stoffwechselaktiven Zustand des Hepatozyten dar [154]. Daher kann und wird der Nachweis der Syntheseleistung des leberspezifischen Parameters Albumin als etablierte Methode zur Beurteilung und Überwachung von Zellkulturen in Metabolismus- und Toxikologiestudien herangezogen.

In der vorliegenden Pilotstudie zeigen sich nach der Inkubation mit den verschiedenen Probandenplasmen deutliche, um eine bis zu 50 % statistisch signifikant niedrigere Syntheseleistung an Mikroalbumin bei den septischen Patienten im Vergleich zu den beiden nicht-septischen Kontrollgruppen. Der direkte Vergleich von überlebenden zu nicht überlebenden septischen Patienten zeigt eine weitere Syntheseeinschränkung um mehr als 30 % bei den verstorbenen Probanden.

Aufgrund der fast ausschließlich in der Leber und der dort in den Hepatozyten stattfindenden Albuminsynthese ist von einer Zellfunktionseinschränkung oder Änderung des Biosynthesemusters durch den zytotoxischen Einfluss des von den septischen Probanden stammenden Plasmas auszugehen. Bei den nicht-septischen Probanden ist dies nach der Inkubation aufgrund der höheren Syntheseleistung von Mikroalbumin nicht zu sehen. HepG2/C3A-Zellen, die mit dem Plasma der beiden Kontrollgruppen (ITS-KS und GP) inkubiert wurden, zeigen hier keine reduzierte Albuminsynthese in Form eines Funktionsverlustes.

Hepatotoxische Effekte auf zellulärer Ebene, die mit einer reduzierten Syntheserate von Albumin einhergehen, sind von verschiedenen Autoren dargestellt worden. So beschreiben Yuan et al. eine reduzierte Kapazität der Diclofenac-Metabolisierung bei Rattenhepatozyten, welche mit einer verminderten Albuminproduktion und der CYP 1A2- und CYP 3A4- Aktivität einherging [155]. In einer weiteren toxikologischen Studie stellten Ullrich et al. nach Inkubation mit

Azetaminophen (AAP = Paracetamol) bei einer Langzeit-Hepatozytenkultur eine deutliche Reduktion der Albumin-Freisetzung um bis zu 75 bis 80 % fest [61].

Der in dieser Arbeit angewendete XTT-Tetrazolium-Reduktionstest wurde erstmals 1983 von Mosman beschrieben, der damit Zellproliferation und Zytotoxizität am Beispiel von Säugetierzellen untersuchte [156]. Der auf Tetrazoliumverbindungen basierende Test ermöglicht, die resultierende Zellüberlebensrate nach dem Einfluss einer zu testenden Verbindung direkt mit Hilfe einer Zellkultur festzustellen. Er erlaubt es, Substanzen mit unbekannter Wirkung auf die Zytotoxizität einfach, schnell und reproduzierbar zu testen, wobei die Zellviabilität (Zellvitalität und -funktionalität) durch die Zugabe reproduzierbarer Materialien bestimmt wird, deren Endprodukte spektroskopisch messbare Färbungen aufweisen [157].

So lassen sich unbekannte Materialien zuverlässig und mit relativ geringem Aufwand auf ihre zytotoxische Wirkung testen. Es handelt es sich um einen Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest, der zum Studium von Wachstumsfaktoren, Nährstoffen, Zytokinen, zytotoxischen und chemotherapeutischen Substanzen dient. Vorteile des XTT-Testes sind Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Nichttoxizität des Tetrazoliumsalses [114, 158, 159]. Die Testmethode beruht auf der Umwandlung von schwach gefärbten oder farblosen nicht toxischen Tetrazoliumsalsen in intensiv gefärbte Formazanderivate bei Zellen mit intakten Mitochondrien. Eine solche Umwandlung findet bei toten Zellen mit avitalen Mitochondrien nicht statt, da das in den Mitochondrien lokalisierte intrazelluläre Reduktionssystem (durch das Enzym Succinatdehydrogenase) inaktiv ist. So kommt es wenige Minuten nach Eintreten des Zelltodes zur Inaktivierung der Mitochondrien, die metabolische Aktivität der Zellen sinkt. Der Test findet zum Beispiel Anwendung in der Immunologie, in der Krebsforschung oder bei Biokompatibilitätsuntersuchungen [157, 160, 161].

Es zeigt sich nach den Inkubationen mit den entsprechenden Probandenplasmen lediglich bei den Patienten im septischen Schock eine geringere Umwandlung von Tetrazoliumsals in das intensiv gefärbte Formazanderivat, was als eine verminderte Zellvitalität gedeutet wird. Sie weisen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den nicht-septischen Kontrollgruppen auf. Auffällig ist, dass bei Betrachtung der Gesamtkollektive die mitochondriale Umwandlung des nicht-

toxischen Farbstoffes lediglich bei den septischen Probanden vermindert ist, jedoch im Vergleich dieser Gruppe die nicht überlebenden Probanden höhere Werte aufweisen als die überlebenden septischen Patienten. Im Verlauf der EISS-Behandlung über 54 Stunden nimmt die Farbstoff-Metabolisierungsrate bei den verstorbenen Patienten stetig und nun deutlich unter das Niveau der überlebenden Probanden ab. Dieser zeitlich scherenartige Verlauf beider septischer Subgruppen mag einerseits daran liegen, dass es erst nach Eintreten des Zelltodes zur Inaktivierung der Mitochondrien und damit zur Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen kommt, andererseits eine Erholung der mitochondrialen Funktion nach Zellstabilisierung (unter der EISS-Behandlung) möglich ist.

Die Laktat-Dehydrogenase ist ein stabiles, im Zytoplasma aller Zellen vorkommendes Enzym, das eine Schlüsselstellung im anaeroben Stoffwechsel der Zelle einnimmt, da das Enzym bei der anaeroben Glykolyse mitwirkt. Neben Aldolase A, Enolase-1 und Phosphoglyzeratkinase-1 gehört die LDH zu den Enzymen, die zur Aufrechterhaltung der zellulären Glucosehomöostase beitragen. Bei intakten Zellen ist das Enzym LDH streng intrazellulär [162]. Es katalysiert reversibel die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Bei der laborchemischen Bestimmung wird die Rückreaktion verwendet, wobei als Coenzym NADH dient. LDH ist in vielen verschiedenen Geweben nachweisbar, unter anderem in der Leber, der Herz- und Skelettmuskulatur, den Erythrozyten, dem lymphatischen und hämatopoetischen Gewebe sowie in der Niere und in Malignomen. Es gibt fünf verschiedene Isoenzyme, die eine unterschiedliche Organverteilung besitzen [153].

Die Plasma-Halbwertszeit der LDH liegt bei 10 ± 2 Stunden, der Normalwert für die LDH-Aktivität im Blutserum liegt (nach der optimierten Standardmethode der DGKC) bei 120 bis 240 U/l. Dieser resultiert aus der täglichen Zellmauserung der zur physiologischen Regeneration befähigten Zelle, ein Zustand, bei dem sich Leberzellproliferation und Leberzelluntergang im Gleichgewicht befinden. Guicciardi et al. bezeichnen diese Homöostase als „physiologische Apoptose“ und sie ist durch eine geordnete nukleäre und zelluläre Fragmentation gekennzeichnet [163]. Ein Anstieg der LDH-Aktivität über die Norm wird unter vielen pathologischen Bedingungen beobachtet, besonders die Isoenzyme 4 und 5 lassen sich bei einer Schädigung der Herkunftszellen von Leber und Skelettmuskulatur fest-

stellen. Als zytosolisches Enzym deutet ein erhöhter Nachweis von intrazytoplasmatischem LDH (insbesondere des LDH-5-Isoenzym der Leber) im Kulturüberstand auf Zellmembranschädigung durch Permeabilitätsstörungen bzw. Zellyse mit zugrunde liegendem Zelltod bei Spätaoptose oder Nekrose hin [164]. Daher wird es als Markerenzym verwendet, um das Absterben der Zellen in der Kultur zu bestimmen, wobei ein Anstieg der LDH-Aktivität keine Rückschlüsse auf die Art des Zellunterganges zulässt.

In der vorgestellten Pilotstudie zeigen sich in beiden Kontrollgruppen (ITS-KS und GP) nach Inkubation normwertige LDH-Werte im Kulturüberstand (ITS-KS: $186 \text{ U/l} \pm 65,5$; GP: $213 \text{ U/l} \pm 43,1$), so dass bei diesen nicht-septischen Gruppen vitale Hepatozyten mit regulierter physiologischer Zellproliferation im Sinne einer Zellmauserung (siehe oben) vorliegen.

Demgegenüber fallen bei der Bestimmung der LDH-Freisetzung im Überstand bei den septischen Patienten im Vergleich zu den nicht-septischen Kontrollgruppen signifikant niedrigere Messergebnisse auf (ITS-S: $130 \text{ U/l} \pm 64,4$). Diese Tendenz ist auch bei Betrachtung der septischen Subgruppen zu sehen (ITS-S/ü: $147 \text{ U/l} \pm 68,6$; ITS-S/nü: $91 \text{ U/l} \pm 28,4$), wobei hier bei den überlebenden Probanden höhere Werte als bei den nicht-überlebenden septischen Patienten festzustellen sind. Diese Ergebnisse sind bei dem ursächlichen Verständnis einer zytosolischen LDH-Freisetzung aufgrund von Permeabilitätsstörungen der Zellmembran bzw. Zellyse überraschend. Legt man einen zytotoxischen Effekt des hinzugegebenen septischen Plasmas auf die HepG2/C3A-Indikatorzellen zugrunde, waren vorab eher deutlich erhöhte Werte bei der septischen Gruppe, insbesondere bei der nicht überlebenden Subgruppe zu erwarten. Es zeigt sich jedoch, dass der zytotoxische Effekt des septischen Plasmas zwar zu einer Leberschädigung mit enzymatischem Funktionsverlust, nicht aber zu einem ausschließlichen Zelluntergang im Sinne spätaoptotischer oder nekrotischer Umbauprozesse mit Membranläsionen oder -ruptur und daraus resultierender Freisetzung zellulärer Bestandteile in den Extrazellulärraum führt. Die Verringerung der LDH-Aktivität lässt vermuten, dass das Plasma der septischen Testgruppe antiproliferative Effekte auf die HepG2/C3A-Indikatorzellen nicht über eine erhöhte Zellsterberate vermittelt. Vielmehr bleibt die Zellvitalität der Hepatozytenzellen

noch weitestgehend unter der beschriebenen Zellfunktionseinschränkung mit deutlich reduzierter Zellproliferation erhalten.

Diese Vermutungen werden auch durch den Live/Dead-Test bestärkt. Die Anfärbung erfolgt an lebenden Zellen durch ein Gemisch spezieller Fluoreszenzfarbstoffe. Das Farbstoffgemisch färbt dabei simultan lebende, vitale Zellen von der intrazellulären Esterase leuchtend grün [165]. Abgestorbene oder absterbende Zellen durchdringt der Farbstoff passiv über die geschädigte Zellmembran und färbt die Hepatozyten rot an [166]. Jeder leuchtend grüne Punkt kennzeichnet eine vitale Leberzelle des Testansatzes. Bereiche mit gehäuft roten Zellen sind als Zeichen eines zytotoxischen Effekts, ausgelöst durch Substanzen im Probandenplasma, zu sehen. Aus dem Verhältnis von lebenden zu toten Zellen lässt sich der relative Anteil an abgetöteten Hepatozyten semiquantitativ ermitteln. Nach Korber et al. fungiert die Zellmembran im Falle des Zelltodes nicht mehr länger als selektive Barriere zwischen Zelle und Umgebung. Daher bietet der Nachweis einer intakten bzw. geschädigten Zellmembran eine schnelle und praktische Methode zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Bakterien und/oder Zellen [167]. In dem hier vorgestellten Zytotoxizitätstest erfolgt keine statistische Auswertung der durchgeführten Live/Dead-Färbung, der Test dient in dieser Arbeit lediglich der Bildokumentation (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Während die HepG2/C3A-Indikatorzellen der nicht-septischen Kontrollgruppen nach Inkubation eine gleichmäßige leuchtendgrüne Anfärbbarkeit der Zellen aufweisen und somit als vital und metabolisch-zellaktiv anzusehen sind, zeigen die Hepatozyten nach Inkubation mit septischem Plasma eine unregelmäßig verstreute rot-fluoreszierende Anfärbbarkeit als Ausdruck des apoptotischen Zellunterganges aufgrund fehlender Zellmembranintegrität einiger, aber nicht aller HepG2/C3A-Zellen (siehe unten).

Die Ergebnisse der aktuellen Studie, welche die Grundlage des in dieser Promotionsarbeit vorgestellten Zytotoxizitätstests ist, zeigen zusammenfassend, dass das Plasma von Patienten mit septischem Schock bzw. in der Initialphase der Sepsis (Zeitpunkt 0 h, also bei Studieneinschluss), welches mit HepG2/C3A-Zellen inkubiert wurde, zu einer Abschwächung wichtiger zellulärer Funktionen bei den Sensorzellen sowohl in der Initialphase als auch im weiteren Verlauf der Sepsis führen.

Im Vergleich der eingeschlossenen Patientengruppen zeigen sich im Verlauf signifikante Unterschiede bezüglich der verschiedenen Hepatozytenfunktionen im Besonderen bei der Aktivitätsbestimmung von CYP-Isoenzym 1A2 mittels EROD-Assay, der Syntheseleistung von Mikroalbumin sowie der LDH-Freisetzung.

Die zur Bestimmung von Vitalität und Proliferation der Sensorzellen durchgeführten Methoden wie XTT-Test und Live/Dead-Färbung zeigen zwar Unterschiede zwischen der septischen Gruppe und der nicht-septischen Kontrollgruppe, doch sind diese nicht als signifikant anzusehen.

Eine reduzierte Vitalität und Proliferation ist bei den nicht überlebenden Patienten stärker ausgeprägt als bei den überlebenden Probanden der septischen Gruppe.

Unter der zweimalig durchgeführten Behandlung der septischen Studiengruppe mit dem extrakorporalen bioartificialen Immununterstützungssystem EISS zeigen sich beim Vergleich beider Subgruppen deutliche Unterschiede bei den Parametern und Behandlungseffekten. So sind bei Betrachtung des Ethoxyresorufin-Tests, der Mikroalbuminsynthese und des XTT-Tests positive Behandlungseffekte lediglich bei den überlebenden Patienten zu sehen. Diese erweisen sich im Vergleich zu den nicht überlebenden Patienten jedoch nicht als statistisch signifikant, vielmehr sind die Unterschiede als Trend anzusehen.

Der vorgestellte Leberzell-basierte Biosensor könnte bei septischen Patienten zu einer frühen Diagnose des Leberversagens beitragen sowie als Verlaufskontrolle und Parameter für die Organregeneration dienen [168].

Die benötigte Zeit für den vorgestellten Zytotoxizitätstest betrug im Rahmen dieser Pilotstudie von der Inkubation des Probandenplasmas mit den Sensorzellen bis zu den Messergebnissen anfangs drei Tage. Dadurch weist der Test eine klare Grenze in der klinischen Anwendbarkeit auf. Der Testansatz konnte im weiteren Verlauf durch die zeitliche Optimierung der Bestimmungen jedoch auf 20 Stunden verkürzt werden und ist damit auch realistisch klinisch einsetzbar (bisher unpublizierte Daten).

Weiterführende klinische Studien mit septischen Patienten und/oder auch bei lebertransplantierten Patienten müssen die klinische Relevanz dieses neuen Tests verifizieren.

Es ist seit langem bekannt, dass die schwere Sepsis unabhängig vom Infektionsherd zu Leberfunktionsstörungen führen kann [169, 170]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Leberfunktion bereits sehr früh nach Einsetzen der Sepsis beeinträchtigt ist [29]. Für die Veränderungen der Leber im Rahmen des septischen Geschehens sind einerseits Veränderungen in der Makro- und der Mikrozirkulation mit nachfolgender Ischämie und Hypoxämie in einzelnen Leberabschnitten verantwortlich [171]. Andererseits können auch verschiedene Substanzen (z. B. Endo- und Exotoxine, Sauerstoffradikale, Zytokine oder Proteasen) eine direkte Leberschädigung auf zellulärer Ebene oder aber Funktionsveränderungen im Sinne eines deutlich erhöhten Sauerstoffbedarfs (aufgrund eines gesteigerten bzw. gestörten hepatischen Metabolismus wie beispielsweise Gluconeogenese oder Fettstoffwechsel) mit konsekutiver Sauerstoffschuld verursachen [17], wobei die Veränderungen des Fettstoffwechsels auch durch eine direkte Schädigung bedingt werden. So konnten diese Veränderung in isolierten Leberzellen nach Inkubation mit Endotoxinen und Zytokinen beobachtet werden [172]. Diese Leberfunktionsstörungen führen zu einer Veränderung der Entzündungsreaktion und der Gerinnung, sowie zu einer Störung des Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsels und der Laktatclearance und scheinen so eine entscheidende Rolle bei weiter möglicher Progredienz hin zur Entstehung eines Multiorganversagens zu spielen.

Endotoxine, aber auch Exotoxine und IL-1 β stimulieren die Kupffer'schen Sternzellen zur Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-8, welche ebenso wie aus dem Darm freigesetztes Noradrenalin eine nachfolgende hepatische Dysfunktion (Sepsis-induzierte Cholestase mit endothelialer Dysfunktion, Zellmembranstörungen bis hin zu Läsionen, Aktivitätsminderung der Na⁺/K⁺-ATPase und verminderte transhepatozelluläre biliäre Elimination potentiell hepatotoxischer Substanzen) bedingt [173, 174].

Laborchemische Parameter sind die zeitlich verzögerten Nachweise der Hyperbilirubinämie und einer erhöhten alkalischen Phosphatase. Ganey et al. zeigen, dass sich eine Zunahme von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) im Blut auf die hepatozelluläre Homöostase auswirkt. Ferner wird beschrieben, dass endogene LPS hepatotoxische Antworten auslösen [175].

Weitere Faktoren stellen lebertoxische Medikamente dar, wobei hier im Besonderen das breite Spektrum der Antibiotika beachtet werden muss [176]. Daneben konnte in einer aktuellen Studie aus dem Jahre 2005 von Vanhorebeek et al. der schädigende Einfluss einer Hyperglykämie auf die mitochondriale Funktion von Leberzellen bei septischen Patienten gefunden werden [177].

Betrachtet man die hepatozelluläre Ebene bei einem septischen Geschehen, zeigen sich verschiedene Wirkungen auf die Leberzellen bzw. die Zellorganellen. Neben der oben beschriebenen herabgesetzten Organperfusion bzw. Organ-oxygenierung schlägt sich die zelluläre Dysfunktion auch in der Substrat-verwertung nieder, so dass eine ausreichende funktionelle und biochemische Homöostase nicht mehr ausreichend aufrechterhalten werden kann.

Die mitochondriale Funktion ist bei systemischen Entzündungsreaktionen erheblich beeinträchtigt [178], wobei die gestörte Sauerstoffverwertung eine zentrale Rolle einnimmt [179]. Kantrow et al. weisen sowohl morphologisch eine Schwellung der Mitochondrien als auch die funktionelle Störung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches in den durch Sepsis veränderten Leberzellen nach [180], wobei Fink et al. Stickoxid als die schädigende Substanz beschreiben [181]. Ebenfalls konnte durch Tavakoli et al. gezeigt werden, dass es im Verlauf zu einem Abfall der mitochondrialen Cytochrom-Komplexe kommt [182]. Letztendlich führt die mitochondriale Dysfunktion zur Erschöpfung der metabolischen Leistung sowie zu einem Rückgang der Energiebereitstellung mit negativem Einfluss auf weitere abhängige Stoffwechselforgänge.

Ischämie und ATP-Mangel mit konsekutivem Abfall des intramitochondrialen und später auch des intrazellulären pH-Wertes führen zu einem Zerfall des Zytoskeletts sowie der assoziierten Strukturen, die auch als Sensor für den allgemeinen Zustand der Zelle dienen können. Es folgt die Auflösung der Verbindungen zwischen Zellmembran und Zytoskelett, was zu Veränderungen der Zellmorphologie und zur Zelldysfunktion und letztendlich zum Verlust der Zellen führt [183].

Ein fortgeschrittener zellulärer Schaden, wie etwa Zellnekrose, wird laborchemisch anhand der Konzentrationserhöhung der mitochondrialen Enzyme manifest. Nishimura et al. haben nachgewiesen, dass der Übertritt zytoplasmatischer Enzyme in das Blut über eine akute vesikuläre Freisetzung geschieht, welche

jedoch nicht automatisch mit einem Zelluntergang einhergeht [184]. Eine Erhöhung der Konzentrationen zytosolischer Enzyme ist somit auch bei reversiblen Zellschädigungen nachweisbar und sie ist auch zum Nachweis eines akuten und temporären Zellschadens bzw. einer Störung der Integrität der Zellmembran geeignet.

Je nach Art, Dauer und Schwere der einwirkenden zytotoxischen Substanzen bzw. nach Ausmaß der Zellhypoxie kann hieraus ein Zelluntergang sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose resultieren, der mit zunehmendem Parenchymverlust eine Zunahme der Leberdysfunktion bewirken kann [185]. Dieser Leberschaden auf parenchymaler Ebene ist auch bei der Sepsis zu sehen, wobei hier ebenfalls sowohl hepatozelluläre Apoptose als auch Nekrose zu finden ist. Dabei ist die Apoptose ein Zeichen der frühen und die Nekrose der späten inflammatorischen Phase [186, 187].

Neben diesen im Rahmen einer schweren Entzündungsreaktion beschriebenen allgemeinen Störungen der Leberorganfunktion, bei denen ursächlich vor allem Zytokine, die großteils direkt in der Leber selbst auf die verschiedenen Stimuli freigesetzt werden und für die Funktionseinschränkung verantwortlich gemacht werden, sind in der Literatur auch Schädigungen in vitro auf HepG2/C3A-Zellen zu finden. Bereits 1997 berichten Wang et al. in einer Studie über die antiproliferative Wirkung der Zytokine TNF- α und IFN- γ auf die Zelllinie HepG2 [188].

So können Zytokine die Leberzellfunktion und auch HepG2/C3A-Zellen modulieren und beeinträchtigen. TNF- α führt zu einer Suppression der menschlichen Apolipoprotein A1-Genexpression und konsekutiv zur Hemmung der Synthese und Sekretion von Apolipoprotein A1 in HepG2/C3A-Zellen [189]. Dies führt unter anderem auf mitochondrialer Ebene zu einer Einschränkung der Komplex-1 abhängigen Zellatmung durch eine Regulationsstörung mitochondrialer Membranporen [190]. TNF- α , IL-1 und besonders IL-6 bewirken die Down-Regulation so genannter ‚negativer‘-Akute-Phase-Proteine (wie Albumin, Präalbumin, Transferrin, Retinol-bindendes Protein, Thyroxin-bindendes Protein und Antithrombin) in HepG2/C3A-Zellen [191]. IL-1 β hemmt die Expression der Thyroxin-bindende Protein-Rezeptor (TR)- β 1 mRNA [192]. Zusätzlich zeigen Jakobs et al., das IL-1 β durch eine direkte Hemmung der hepatischen Gentranskription in HepG2/C3A-

Zellen sowohl die Thyroxin-5'-Deiodinase als auch die Promotoraktivität und damit möglicherweise seine Wirkung auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel inhibiert [193]. Kuhla et al. weisen nach, dass TNF- α sowohl alleine, aber wesentlich auch über eine Hochregulation von Fas/FasL (so genannte ‚Todesrezeptoren‘ der Apoptose) hepatozelluläre Apoptose von HepG2-Zellen vermittelt [194]. TNF- α zeigt aber auch zytotoxisch nekrotisierende Effekte auf HepG2-Zellen [195]. Nakai et al. veröffentlichten Versuche, bei denen die Behandlung von HepG2-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IL-6 unter anderem zu einer signifikanten Abnahme der CYP 1A2-Aktivität führten. Die Behandlung mit TNF- α zeigt darüber hinaus eine signifikante Reduktion der Aktivität von CYP 2E1 in den Indikatorzellen [196]. Weiter belegen Li et al. in ihren Versuchen, dass Cholesterin 7 α -Hydroxylase (CYP 7A1), ein Enzym des klassischen Fettstoffmetabolismus, welches die Gallensäuresynthese von Cholesterin zu 7 α -Hydroxycholesterin katalysiert, auch durch inflammatorische Zytokine (IL-1 β) in HepG2-Zellen unterdrückt wird [197]. Bei Betrachtung des Energiehaushaltes in HepG2-Zellen dokumentieren Kassardjian et al. in ihren aktuellen Versuchen, dass TNF- α sowohl die Aktivität als auch die Protein-Expression der Na⁺/K⁺-ATP-ase signifikant reduziert [198]. Weiterhin zeigt sich der Einfluss auf HepG2-Zellen durch Interleukine in der Arbeit von Senn et al., in der die IL-6-Interaktion als eines von mehreren proinflammatorischen Zytokinen in der Insulin-Resistenz vermittelten Hemmung der Signaltransduktion in Hepatozyten während der systemischen Inflammation betrachtet wird. Hier beschreiben die Autoren zusammenfassend, dass die Induktion durch IL-6 vermittelt nach der Behandlung mit HepG2-Zellen ein wichtiger Mechanismus der Insulinresistenz auf zellulärer Ebene darstellt [199]. Weiterhin belegen Rosado et al. in ihren 2001 veröffentlichten Versuchen, dass TNF- α in HepG2-Zellen den Ca²⁺-Einfluss in die Zelle hemmt. So nennen die Autoren als mögliche Ursachen eine Beeinflussung der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts mit konsekutiver Störung der Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die für Wachstums- und Differenzierungsprozesse verantwortlich sind [200].

Morphologisch ist die Apoptose durch charakteristische Merkmale gekennzeichnet, die sie von der hypoxisch induzierten Nekrose abgrenzen. Unter dem Einfluss bzw. als Folge der Induktion einer Zytokinantwort, aber auch durch die

beschriebene mitochondriale Dysfunktion bei Hypoxie kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten [201, 202]. Die Integrität der Organellen bleibt im Gegensatz zur Nekrose erhalten und der Stoffwechsel läuft anfänglich normal und im weiteren Verlauf über einen langen Zeitraum reduziert weiter. Der Zellkern schrumpft, das Chromatin verdichtet sich und die Zytoplasmamembran verformt sich. So genannte apoptotische Körperchen schnüren sich von der Zelle ab, jedoch bleiben die Organellen, wie Mitochondrien oder endoplasmatisches Retikulum, sowie die Zytoplasmamembran bis zu diesem Zeitpunkt intakt. Auffällig ist auch das Auftreten einzelner apoptotischer Zellen in einem normalen Zellverband, während im Gegensatz dazu bei der Nekrose viele benachbarte Zellen unter Auflösung der Zellmembran untergehen und ihren Zellinhalt in die Umgebung entleeren. Darunter befinden sich hochaktive Stoffe, wie Zytokine, Sauerstoffradikale und Enzyme, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen [203].

Alle Mechanismen münden weitgehend unabhängig vom Auslöser über die Endstrecke eines progredienten Verlustes vitaler Zellen in eine Organdysfunktion, Multiorgan dysfunktion sowie ultimativ in die irreversible Organschädigung bis hin zum irreversiblen Multiorganversagen.

Alle in der Literatur beschriebenen Einschränkungen der Leberfunktion werden mit dem in dieser Promotion vorgestellten Leberzell-basierten Biosensor ebenfalls erfasst. So zeigen sich im Rahmen einer Sepsis, eines septischen Schocks und/oder eines Multiorganversagens bei dem vorgestellten Test toxische Wirkungen auf zellulärer Ebene, die bezüglich der Zellfunktion eine deutliche Funktionseinschränkung bedeuten. Die Vitalität der eingesetzten Leberzellen war im Vergleich zu den nicht-septischen Kontrollgruppen reduziert, ohne bereits sichere Zeichen einer Zellnekrose aufzuweisen.

Wie bereits oben erwähnt, müssen fallzahlstärkere weiterführende klinische Studien mit septischen Patienten die klinische Relevanz des vorgestellten Biosensors bestätigen.

6. Zusammenfassung

Die Entwicklung eines Leberversagens und die späte Diagnose dieser Erkrankung stellt ein großes Problem bei septischen Patienten dar. Die frühe Diagnose eines Leberfunktionsschadens ermöglicht den frühzeitigen Beginn einer Therapie und führt zu einer Verbesserung der Prognose dieser Patienten.

Traditionelle statische Leberfunktionstests wie die Aktivitätsbestimmung leberspezifischer Transaminasen, der LDH und der alkalischen Phosphatase, die Bestimmung von Bilirubin und Albumin oder die von Gerinnungsfaktoren zeigen ihre Schwäche in der zeitverzögerten Feststellung einer Leberfunktionsstörung. Dynamische Tests wie die Bestimmung der ICG-Clearance oder der MEGX-Test sind hier als deutlich empfindlicher anzusehen, haben jedoch Schwächen in der praktischen Durchführung bei hochseptischen Patienten, in ihrem Nebenwirkungsprofil der zu applizierenden Indikatorsubstanz und im Besonderen in der Nicht-Differenzierbarkeit eines bestehenden Leberzellschadens zu einer hepatischen Perfusionsstörung.

Im Rahmen dieser Promotion wurde ein selbst entwickeltes Biosensorsystem (Zytotoxizitätstest) unter Verwendung der etablierten humanen Hepatoblastomzelllinie HepG2/C3A vorgestellt, das der frühzeitigen Diagnose eines Leberschadens bzw. Leberversagens dienen soll.

In einem standardisierten Mikrotiterplatten-Assay sollte die Toxizität des Patientenplasmas auf zellulärer Ebene erfasst werden. Nach der Inkubation des Patientenplasmas mit den Sensorzellen wurde die Metabolisierungsaktivität von Cytochrom P450-Isoenzym 1A2 (durch den Ethoxyresorufin-Test), die Syntheseleistung von Albumin sowie die Vitalität und Proliferation mittels XTT-Test und LDH-Nachweis im Kulturüberstand und die Live/Dead-Färbung bestimmt bzw. durchgeführt.

Der entwickelte Hepatozyten-Biosensor wurde im Rahmen dieser Promotion bei einer Sepsis-Diagnostik-Studie (Pilotstudie) angewandt. In diese wurden insgesamt 28 Probanden eingeschlossen, die sich folgendermaßen auf drei Testgruppen verteilten:

- 10 intensivpflichtige Patienten mit septischem Schock (= ITS-S) unter zweimaliger Behandlung mit dem zellbasierten extrakorporalen bioartificialen Immununterstützungssystem EISS mit jeweils vier Messzeitpunkten,
- 5 intensivpflichtige Patienten ohne Zeichen einer Sepsis als Kontrollgruppe I (= ITS-KS),
- 13 gesunde freiwillige Probanden als Kontrollgruppe II (= GP).

Die 28-Tage-Letalität der ITS-S-Gruppe betrug 30 %. Alle Patienten bzw. Probanden der ITS-KS- sowie der GP-Gruppe überlebten.

Unter der Behandlung mit dem zellbasierten extrakorporalen Plasmaperfusionssystem EISS waren bei Betrachtung der untersuchten Parameter und der Behandlungseffekte signifikante Unterschiede der septischen Studiengruppe zu beiden Kontrollgruppen festzustellen. Nicht signifikant, allenfalls als Trend anzusehen, waren deutliche Unterschiede zwischen den überlebenden und nicht überlebenden septischen Probanden zu erkennen.

Die CYP 1A2-Aktivität und die Syntheseleistung von Mikroalbumin waren in den HepG2/C3A-Zellen, welche mit dem Plasma der septischen Patienten inkubiert wurden, signifikant geringer. Besonders niedrige Messergebnisse zeigten hier die nicht überlebenden Probanden der septischen Testgruppe.

Die CYP 1A2-Aktivität lies zum Zeitpunkt 0 h (Studieneinschluss) signifikante Unterschiede zwischen den überlebenden und nicht überlebenden septischen Patienten erkennen. Im 54-stündigen Beobachtungszeitraum dieser Studie zeigten sich bezüglich der CYP 1A2-Aktivität und der Syntheseleistung von Mikroalbumin im Trend bei den überlebenden septischen Patienten ansteigende,- bei den nicht überlebenden Probanden fallende Aktivitäten.

Im XTT-Test waren in der septischen Gruppe eine geringere Zellvitalität und im 54-stündigen Studienverlauf bei den hier nicht überlebenden Probanden abfallende Messergebnisse bei der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes zu Formazan festzustellen.

Die LDH-Messung im Kulturüberstand zeigte signifikant niedrigere Werte bei der septischen Studiengruppe und wies ebenfalls abfallende Werte im Verlauf des 54-stündigen Beobachtungszeitraumes auf.

Bei den Patienten mit septischem Schock führte das Plasma, welches mit HepG2/C3A-Zellen inkubiert wurde, zu einer Beeinträchtigung der zellulären Funktion der eingesetzten Sensorzellen.

Der vorgestellte leberzellbasierte Biosensor könnte dazu beitragen, die frühe Diagnose des Leberversagens bei septischen Patienten zu stellen und zeigt in der Pilotstudie im Vergleich zur Bestimmung der Serumbilirubinkonzentration eine zuverlässigere prognostische Aussage bezüglich der Sterblichkeit. Weitere Einsatzmöglichkeiten dieses Zytotoxizitätstests sind in der Therapieverlaufskontrolle oder der Transplantationsmedizin zu sehen, wobei weiterführende klinische, fallzahlstärkere Studien die Relevanz dieses neuen Tests bestätigen müssen.

7. Anhang

7.1 Allgemein

7.1.1 Scores

APACHE II:

Der Score besteht aus drei verschiedenen Anteilen:

- 1) aus einem akuten physiologischen Score, (zwölf gemessene Parameter),
- 2) aus einem altersbezogenen Score,
- 3) aus einem Score zur Beurteilung des chronischen Krankheitszustandes.

Zu 1)

Physiologische Variable	+ 4	+ 3	+ 2	+ 1	0	+ 1	+ 2	+ 3	+ 4
Körperkerntemperatur (°C)	41,0	39,0–40,9		38,5–38,9	36,0–38,4	34,0–35,9	32,0–33,9	30,0–31,9	29,9
MAP (mmHg)	160	130–159	110–129		70–109		50–69		49
Herzfrequenz (1/min)	180	140–179	110–139		70–109		55–69	40–54	39
Atemfrequenz (spontan oder maschinell)	50	35–49		25–34	12–24	10–11	6–9		5
a) FiO ₂ 0,5: AaDO ₂ b) FiO ₂ < 0,5: PaO ₂	500	350–499	200–349		< 200 > 70	61–70		55–60	< 55
arterieller pH	7,70	7,60–7,69		7,50–7,59	7,33–7,49		7,25–7,32	7,15–7,24	< 7,15
S-Natrium (mmol/l)	180	160–179	155–159	150–154	130–149		120–129	111–119	110
S-Kalium (mmol/l)	7,0	6,6–6,9		5,5–5,9	3,5–5,4	3,0–3,4	2,5–2,9		< 2,5
S-Kreatinin (mg/dl) (bei akuter NI: doppelte Punktzahl)	3,5	2–3,4	1,5–1,9		0,6–1,4		< 0,6		
Hämatokrit (%)	60		50,0–59,9	46,0–46,9	30,0–45,9		20,0–29,9		< 20
Leukozyten (10 ³ /mm ³)	40		20,0–39,9	15,0–19,9	3,0–14,9		1,0–2,9		< 1,0
Glasgow Coma Score	Punkte = 15 – aktueller GCS								
S-HCO ₃ ⁻ (wenn keine BGA vorhanden)	52,0	41,0–51,9		32,0–40,9	22,0–31,9		18,0–21,9	15,0–17,9	< 15

Zu 2)

Alter	44	45–54	55–64	65–74	75
Punkte	0	2	3	5	6

Zu 3)

Operativer Status	Gesundheitsstatus	Punkte
Nicht operiert	Anamnestisch Organinsuffizienz oder Immunschwäche	+ 5
	Anamnestisch Organsuffizienz und Immunkompetenz	+ 0
Postoperativer Patient nach Notfall-OP	Anamnestisch Organinsuffizienz oder Immunschwäche	+ 5
	Anamnestisch Organsuffizienz und Immunkompetenz	+ 0
Postoperativer Patient nach Wahleingriff	Anamnestisch Organinsuffizienz oder Immunschwäche	+ 2
	Anamnestisch Organsuffizienz und Immunkompetenz	+ 0

Die Organinsuffizienz und/oder Immunschwäche müssen vor dem Krankenhausaufenthalt bekannt gewesen sein und dem folgenden Kriterienkatalog entsprechen:

Leber: Histologisch gesicherte Zirrhose, gesicherte portale Hypertension, stattgehabte Ösophagusvarizenblutung, vorausgegangenes Leberkoma, hepatische Enzephalopathie

Herz/Kreislauf: Herzinsuffizienz im Stadium NYHA IV

Lunge: Schwere Lungenerkrankung mit deutlicher Leistungsminderung, gesicherte chronische Hypoxämie und/oder Hyperkapnie, dokumentierte pulmonale Hypertension ($PAP_{\text{mittel}} > 40 \text{ mmHg}$)

Niere: Chronische Dialyse

Immunsystem: Anamnestisch Immunsuppressiva, Chemotherapie oder Radiatio, Low-dose-Steroide über 30 Tage oder $15 \text{ mg/kg} > 5 \text{ Tage}$, Infektionsgefährdung durch Leukämie, Lymphom oder metastasierendes Karzinom

Die erforderlichen Daten werden im Rahmen der stationären Aufnahme eines Intensivpatienten ermittelt und über 24 Stunden gesammelt, wobei der jeweils schlechteste Wert für die Berechnung des Scores herangezogen wird.

SOFA:

Grundlage der Bewertung ist die tägliche Erhebung (24-Stunden-Zeitraum) der jeweils schlechtesten Werte für jedes der sechs Organsysteme in vier Schweregraden.

Organ	Parameter/Punkte	1	2	3	4
Lunge	PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	< 400	< 300	< 200 mit Beatmung	< 100 mit Beatmung
Niere	Kreatinin (mg/dl) oder Urinmenge (ml/Tag)	1,2–1,9	2,0–3,4	3,5–4,9 < 500	> 5,0 < 200
Leber	Bilirubin (mg/dl)	1,2–1,9	2,0–5,9	6,0–11,9	> 12,0
Herz/Kreislauf	Blutdruck (mmHg) und Katecholamine	MAP < 70	Katechol.: niedrig	Katechol.: mittel	Katechol.: hoch
Blut	Thrombozyten (10 ³ /mm ³)	< 150	< 100	< 50	< 20
ZNS	Glasgow Coma Scale	14–13	12–10	9–6	< 6

SAPS II:

Variable/ Punkte	0	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13
HF (1/min)	70–119		40–69		120–159			≥ 160			< 40		
MAP (mmHg)	100–199		≥ 220			70–99							< 70
KT (°C)	< 39			≥ 39									
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)*							≥ 200		100–199		< 100		
Ausfuhr Urin (l/Tag)	≥ 1,0				0,5–1,0						< 0,5		
S-Harnstoff (g/l)	< 0,6						0,6–1,8			> 1,8			
Leukozyten (10 ³ /mm ³)	1,0–20			≥ 20								< 1,0	
S-Kalium (mmol/l)	3,0–5,0			> 5,0 < 3,0									
S-Natrium (mmol/l)	125–144	≥ 145				< 125							
S-Bikarbonat (mmol/l)	> 20			15–20			< 15						
S-Bilirubin (µmol/l)	< 68				68–102				> 102				

* Bei maschineller Beatmung
Wurde ein Laborwert nicht bestimmt, gilt dieser als Normalwert und wird mit 0 Punkten bewertet.

Variable/Punkte	0	5	7	12	13	15	16	18	26
Alter	< 40		40–59	60–69		70–74	75–79	≥ 80	
GCS	14–15	11–13	9–10		6–8				< 6

Variable/ Punkte	0	6	8	9	10	17
Chronische Leiden*				metast. Neoplasie	hämatolog. Neoplasie	AIDS
Aufnahme- Status	geplant chirurgisch	medizinisch	nicht geplant chirurgisch			

* Bei chronischen Leiden darf nur das mit der höchsten Punktzahl berechnet werden.

Der Punktwert fällt umso höher aus, je mehr der gemessene Wert von der Norm abfällt. Erfasst werden die jeweils schlechtesten Werte innerhalb der vergangenen 24 Stunden.

GCS:

Punkte	Augen öffnen	Verbales Äußern	Motorik
1	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion auf Schmerz
2	auf Schmerzreiz	unverständliche Laute	Strecksynergismen auf Schmerz
3	bei Aufforderung	unzusammenhängende Worte	Beugemechanismen auf Schmerz
4	spontan	konversationsfähig, desorientiert	ungezielt auf Schmerz
5		konversationsfähig, orientiert	gezielt auf Schmerz
6			gezielt nach Aufforderung

7.1.2 Mikrobiologische Befunde und nachgewiesene Infektionsquellen der ITS-S-Gruppe (n = 10)

Patient	Mikrobiologische Befunde	Sepsis: alle septischer Schock
ITS-S; 1	Blutkultur (14.12.03): Streptococcus pneumoniae, Trachealsekret (20.12.03): < 10.000 Candida glabrata KBE/ml, BK (23.12.03): Candida tropicalis	Bakteriämie (pneumogen); gram-positiv, Pilze
ITS-S; 2	Trachealsekret (04.01.04): Pseudomonas aeruginosa, BK (zentral) (07.01.04): Staphylococcus epidermidis	Bakteriämie (pneumogen); gram-negativ gram-positiv
ITS-S; 3	Trachealsekret (26.01.04): Neisseria spp. > 100.000 KBE/ml, Katheterurin (26.01.04): Proteus mirabilis und Enterokokken > 100.000 KBE/ml	Bakteriämie (pneumogen), Urosepsis; gram-negativ
ITS-S; 4	BK (zentral) (08.02.04): Koagulase-negative Staphylokokken, Shaldon-Katheter (09.02.04): Staphylococcus epidermidis, Trachealsekret (09.02.04): Candida albicans, Trachealsekret (10.02.04): Koagulase-negative Staphylokokken > 100.000 KBE/ml, Pilz-Diagnostik (10.02.04): gram-negative Stäbchen, Candida albicans, Sprosspilze; Candida albicans	Bakteriämie (pneumogen); gram-positiv
ITS-S; 5	Trachealsekret (08.02.04): Escherichia coli > 100.000 KBE/ml; β-hämolyisierende Streptokokken	Bakteriämie (pneumogen); gram-positiv und gram-negativ
ITS-S; 6	Trachealsekret (10.03.04): Candida parapsilosis, kein relevanter Keimnachweis	Mediastinitis (pneumogen)
ITS-S; 7	Blutkultur (15.03.04): Enterococcus faecalis, Gelenkpunktat (15.03.04): Enterococcus faecalis, Blasenkatheeter (16.03.04): Enterokokken	TEP-Infektion; Bakteriämie; gram-positiv
ITS-S; 8	TS und BAL (24.03.04): Citrobacter coseri > 100.000 KBE/ml, zusätzlich in BAL: Candida albicans < 100 KBE/ml	Bakteriämie (pneumogen); gram-negativ
ITS-S; 9	DK (24.03.04 und 30.03.04): Candida albicans < 10.000 KBE/ml, Pilz-Diagnostik (26.03.04): Candida albicans, kein relevanter Keimnachweis	Abszess (Niere)
ITS-S; 10	Nasenabstrich (05.04.04): Candida krusei, Anus/Rektum (05.04.04): Candida krusei, BK und WA (06.04.04): Candida krusei: 1000 KBE/ml	Bakteriämie; Wundinfektion im ventralen Thoraxbereich, Pilze

BAL: Bronchiallavage
BK: Blutkultur
DK: Dauerblasenkatheter

KBE/ml: Koloniebildende Einheiten/Milliliter
o.B.: ohne (pathologischen) Befund
spp.: Spezies

TEP: Totale Endoprothese
TS: Trachealsekret
WA: Wundabstrich

7.1.3 Messwerte, Signifikanzen und Korrelationen ausgewählter Parameter

Studieneinschluss: klinische Parameter; Mittelwert und Standardabweichung

	1) ITS-S (n = 10)	2) ITS-S/ü (n = 7)	3) ITS-S/nü (n = 3)	4) ITS-KS (n = 5)	5) GP (n = 13)
ALAT ¹⁾	59,89 ± 64,70	70,32 ± 72,71	28,60 ± 16,12	24,40 ± 21,48	10,67 ± 8,85
ASAT ¹⁾	114,0 ± 194,02	137,3 ± 223,47	43,95 ± 26,94	33,44 ± 22,86	18,30 ± 4,73
Bilirubin ¹⁾	38,86 ± 46,55	28,94 ± 22,49	62,00 ± 84,19	9,24 ± 4,05	8,96 ± 4,83
Ammoniak ¹⁾	62,30 ± 30,21	71,30 ± 49,07	53,30 ± 2,55		
Laktat ¹⁾	2,70 ± 1,78	2,68 ± 1,68	2,75 ± 2,76		
CrP ¹⁾	255,8 ± 109,01	248,3 ± 88,01	273,3 ± 172,98	100,2 ± 66,54	
PCT ¹⁾	18,24 ± 33,60	19,66 ± 39,91	14,92 ± 16,62		
Thrombozyten ¹⁾	160,8 ± 109,65	185,1 ± 115,36	104,0 ± 85,25	210,6 ± 66,73	
Leukozyten ¹⁾	13,40 ± 9,27	14,96 ± 10,02	9,76 ± 7,56	8,89 ± 1,93	
Harnstoff ¹⁾	12,07 ± 7,16	11,91 ± 5,07	12,43 ± 12,38	10,89 ± 8,58	4,41 ± 0,68
Kreatinin ¹⁾	145,9 ± 103,0	165,1 ± 109,29	100,9 ± 87,04	216,4 ± 205,26	72,85 ± 10,02
Quick ¹⁾	78,10 ± 18,79	78,71 ± 17,98	76,67 ± 24,83	91,40 ± 5,37	
INR	1,30 ± 0,23	1,30 ± 0,21	1,29 ± 0,30	1,06 ± 0,05	
aPTT ¹⁾	40,67 ± 7,76	38,69 ± 8,36	45,30 ± 3,99	34,96 ± 5,96	
APACHE II	28,10 ± 4,51	26,57 ± 4,58	31,67 ± 1,16	11,80 ± 4,38	
SOFA	11,90 ± 3,18	11,43 ± 3,21	13,00 ± 3,46	4,0 ± 3,32	
SAPS II	60,60 ± 12,20	57,86 ± 13,16	67,00 ± 7,94	36,40 ± 10,92	
GCS	6,30 ± 4,99	7,71 ± 5,44	3,00 ± 0,00	14,8 ± 0,45	15 ± 0,00
Alter	60,30 ± 13,87	56,14 ± 14,79	70,00 ± 2,65	77,80 ± 8,87	39,00 ± 9,57
28-Tage Letalität ¹⁾	30	0	100	0	0

Asymptotische Signifikanzen p (nach Kruskal-Wallis-Test)

	KW-Test 1)↔2)	KW-Test 1)↔3)	KW-Test 1)↔4)	KW-Test 1)↔5)	KW-Test 2)↔3)	KW-Test 2)↔4)	KW-Test 2)↔5)	KW-Test 3)↔4)	KW-Test 3)↔5)	KW-Test 4)↔5)
ALAT ¹⁾	0,795	0,788	0,143	0,003 *	0,505	0,242	0,001 *	0,377	0,002 *	0,167
ASAT ¹⁾	1,000	1,000	0,306	0,018 *	1,000	0,482	0,012 *	0,717	0,018 *	0,324
Bilirubin ¹⁾	0,961	0,993	0,020 *	0,003 *	0,909	0,031 *	0,001 *	0,082	0,002 *	0,657
Ammoniak ¹⁾	1,000	1,000			1,000					
Laktat ¹⁾	0,870	0,922			0,699					
CrP ¹⁾	0,883	0,940	0,142		0,732	0,370		0,041		
PCT ¹⁾	0,730	0,713			0,424					
Thrombozyten ¹⁾	0,659	0,574	0,462		0,305	0,755		0,599		
Leukozyten ¹⁾	0,732	0,715	0,270		0,425	0,411		0,553		
Harnstoff ¹⁾	0,806	0,843	0,391	0,002 *	0,569	0,551	0,001 *	0,731	0,001 *	0,104
Kreatinin ¹⁾	0,659	0,574	0,759	0,243	0,305	0,885	0,097	0,696	0,158	0,349
Quick ¹⁾	0,883	0,940	0,197		0,732	0,307		0,558		
INR	0,844	0,896	0,014 *		0,648	0,022 *		0,053 *		
aPTT ¹⁾	0,590	0,436	0,178		0,210	0,378		0,286		
APACHE II	0,458	0,204	0,002 *		0,083	0,003 *		0,003 *		
SOFA	0,882	0,938	0,005 *		0,728	0,010 *		0,018 *		
SAPS II	0,659	0,574	0,010 *		0,305	0,024 *		0,028 *		
GCS	0,525	0,286	0,006 *	0,001 *	0,123	0,012 *	0,001 *	0,009 *	0,001 *	0,107
Alter	0,554	0,368	0,014 *	0,001 *	0,169	0,019 *	0,001 *	0,029 *	0,001 *	0,001 *

KW-Test: Kruskal-Wallis-Test

¹⁾ Einheiten: siehe Tabelle 4, Seite 38

*) Signifikanz p ≤ 0,05

Exakte Signifikanzen p (nach Mann-Whitney-U-Test)

	U-Test 1)↔2)	U-Test 1)↔3)	U-Test 1)↔4)	U-Test 1)↔5)	U-Test 2)↔3)	U-Test 2)↔4)	U-Test 2)↔5)	U-Test 3)↔4)	U-Test 3)↔5)	U-Test 4)↔5)
ALAT ¹⁾	0,852	0,711	0,171	0,003 *	0,643	0,177	0,001 *	0,571	0,038 *	0,173
ASAT ¹⁾	1,000	1,000	0,354	0,018 *	1,000	0,329	0,009 *	0,857	0,076	0,336
Bilirubin ¹⁾	0,962	0,937	0,019 *	0,003 *	1,000	0,018 *	0,001 *	0,250	0,111	0,703
Ammoniak ¹⁾	1,000	1,000			1,000					
Laktat ¹⁾	0,876	0,889			0,857					
CrP ¹⁾	0,887	0,811	0,008 *		0,833	0,018 *		0,071		
PCT ¹⁾	0,740	0,573			0,517					
Thrombozyten	0,669	0,469	0,513		0,383	0,876		0,250		
Leukozyten ¹⁾	0,740	0,573	0,310		0,517	0,268		0,786		
Harnstoff ¹⁾	0,813	0,692	0,440	0,001 *	0,667	0,343	0,001 *	1,000	0,111	0,117
Kreatinin ¹⁾	0,669	0,469	0,768	0,101	0,383	0,876	0,006 *	0,250	0,439	0,387
Quick ¹⁾	0,887	0,8,11	0,206		0,833	0,149		0,786		
INR	0,887	0,811	0,013 *		0,667	0,010 *		0,143		
aPTT ¹⁾	0,601	0,371	0,206		0,267	0,432		0,143		
APACHE II	0,475	0,217	0,001 *		0,117	0,003 *		0,036 *		
SOFA	0,887	0,811	0,003 *		0,833	0,010 *		0,036 *		
SAPS II	0,669	0,469	0,008 *		0,383	0,030 *		0,036 *		
GCS	0,601	0,371	0,005 *	0,001 *	0,183	0,018 *	0,001 *	0,036 *	0,004 *	0,566
Alter	0,601	0,371	0,013 *	0,001 *	0,183	0,010 *	0,008 *	0,143	0,004 *	0,001 *

Studienbeginn: Zeitpunkt 0 h: klinische Parameter: Mittelwert und Standardabweichung

	1) ITS-S (n = 10)	2) ITS-S/ü (n = 7)	3) ITS-S/nü (n = 3)	4) ITS-KS (n = 5)	5) GP (n = 13)
ALAT ¹⁾	54,71 ± 84,55	64,84 ± 101,27	31,07 ± 14,21	24,40 ± 21,48	10,67 ± 8,85
ASAT ¹⁾	94,34 ± 179,26	109,0 ± 216,66	60,20 ± 35,94	33,44 ± 22,86	18,30 ± 4,73
Bilirubin ¹⁾	33,35 ± 38,17	26,94 ± 24,36	48,30 ± 65,56	9,24 ± 4,05	8,96 ± 4,83
Ammoniak ¹⁾	80,70 ± 3,25	78,40 ± 0,00	83,00 ± 0,00		
Laktat ¹⁾	1,61 ± 0,79	1,60 ± 0,93	1,65 ± 0,21		
CrP ¹⁾	216,6 ± 134,41	241,6 ± 152,31	158,3 ± 66,49	100,2 ± 66,54	
PCT ¹⁾	13,98 ± 30,15	16,71 ± 36,35	7,61 ± 6,26		
Thrombozyten ¹⁾	170,3 ± 112,19	198,6 ± 23,14	104,3 ± 42,72	210,6 ± 66,73	
Leukozyten ¹⁾	11,89 ± 7,47	13,94 ± 7,92	7,11 ± 3,73	8,89 ± 1,93	
Harnstoff ¹⁾	12,68 ± 7,93	11,78 ± 3,89	14,79 ± 15,11	10,89 ± 8,58	4,41 ± 0,68
Kreatinin ¹⁾	133,65 ± 93,39	149,3 ± 96,58	97,13 ± 91,71	216,4 ± 205,26	72,85 ± 10,02
Quick ¹⁾	84,50 ± 15,03	86,71 ± 12,84	79,33 ± 21,55	91,4 ± 5,37	
INR	1,23 ± 0,17	1,20 ± 0,13	1,31 ± 0,27	1,06 ± 0,05	
aPTT ¹⁾	40,15 ± 9,11	41,94 ± 10,57	35,97 ± 0,75	34,96 ± 5,96	
APACHE II	24,20 ± 5,83	22,14 ± 4,14	29,00 ± 7,21		
SOFA	10,10 ± 3,25	9,43 ± 3,05	11,67 ± 3,79	4,0 ± 3,32	
SAPS II	53,30 ± 14,36	49,57 ± 15,76	62,00 ± 4,58	36,40 ± 10,92	
GCS	6,70 ± 5,54	8,29 ± 6,02	3,00 ± 0,00	14,8 ± 0,45	15 ± 0,00
Alter	60,30 ± 13,87	56,14 ± 14,79	70,00 ± 2,65	77,80 ± 8,87	39,00 ± 9,57
28-Tage Letalität ¹⁾	30	0	100	0	0

U-Test: Mann-Whitney-U-Test

¹⁾ Einheiten: siehe Tabelle 4, Seite 38

^{*)} Signifikanz $p \leq 0,05$

Asymptotische Signifikanzen p (nach Kruskal-Wallis-Test)

	KW-Test 1)↔2)	KW-Test 1)↔3)	KW-Test 1)↔4)	KW-Test 1)↔5)	KW-Test 2)↔3)	KW-Test 2)↔4)	KW-Test 2)↔5)	KW-Test 3)↔4)	KW-Test 3)↔5)	KW-Test 4)↔5)
ALAT ¹⁾	0,961	0,993	0,391	0,005 *	0,909	0,664	0,004 *	0,819	0,005 *	0,167
ASAT ¹⁾	0,806	0,843	0,391	0,018 *	0,569	0,724	0,019 *	0,708	0,018 *	0,324
Bilirubin ¹⁾	0,883	0,940	0,037	0,012 *	0,732	0,056	0,005 *	0,136	0,010 *	0,657
Ammoniak ¹⁾	0,480	0,472			0,317					
Laktat ¹⁾	1,000	1,000			1,000					
CrP ¹⁾	0,732	0,715	0,142		0,425	0,310		0,157		
PCT ¹⁾	0,883	0,940			0,732					
Thrombozyten	0,659	0,574	0,159		0,305	0,385		0,291		
Leukozyten ¹⁾	0,590	0,436	0,624		0,210	0,600		0,531		
Harnstoff ¹⁾	0,805	0,842	0,462	0,001 *	0,568	0,696	0,001 *	0,821	0,001 *	0,104
Kreatinin ¹⁾	0,659	0,574	0,713	0,345	0,305	0,875	0,195	0,667	0,257	0,349
Quick ¹⁾	0,806	0,843	0,499		0,569	0,779		0,833		
INR	0,883	0,940	0,014 *		0,732	0,031 *		0,057		
aPTT ¹⁾	0,961	0,993	0,221		0,909	0,348		0,603		
APACHE II	0,581	0,423	0,005 *		0,202	0,008 *		0,011 *		
SOFA	0,693	0,641	0,012 *		0,359	0,029 *		0,035 *		
SAPS II	0,623	0,502	0,043 *		0,253	0,118		0,091		
GCS	0,522	0,283	0,015 *	0,001 *	0,122	0,041 *	0,001 *	0,025 *	0,001 *	0,107
Alter	0,554	0,368	0,014 *	0,001 *	0,169	0,019 *	0,001 *	0,029 *	0,001 *	0,001 *

Exakte Signifikanzen p (nach Mann-Whitney-U-Test)

	U-Test 1)↔2)	U-Test 1)↔3)	U-Test 1)↔4)	U-Test 1)↔5)	U-Test 2)↔3)	U-Test 2)↔4)	U-Test 2)↔5)	U-Test 3)↔4)	U-Test 3)↔5)	U-Test 4)↔5)
ALAT ¹⁾	0,962	0,937	0,440	0,001 *	1,000	0,530	0,002 *	0,571	0,025 *	0,173
ASAT ¹⁾	0,813	0,692	0,440	0,003 *	0,667	0,755	0,014 *	0,250	0,025 *	0,336
Bilirubin ¹⁾	0,887	0,811	0,040	0,004 *	0,833	0,030 *	0,006 *	0,393	0,146	0,703
Ammoniak ¹⁾	0,667	0,667			1,000					
Laktat ¹⁾	1,000	1,000			1,000					
CrP ¹⁾	0,740	0,573	0,055		0,517	0,073		0,250		
PCT ¹⁾	0,887	0,811			0,833					
Thrombozyten	0,669	0,469	0,165		0,383	0,432		0,071		
Leukozyten ¹⁾	0,601	0,371	0,679		0,267	0,343		0,571		
Harnstoff ¹⁾	0,813	0,692	0,513	0,001 *	0,667	0,530	0,001 *	0,786	0,004 *	0,117
Kreatinin ¹⁾	0,669	0,469	0,768	0,186	0,383	0,876	0,024 *	0,250	0,439	0,387
Quick ¹⁾	0,813	0,692	0,513		0,667	0,639		0,571		
INR	0,887	0,811	0,013 *		0,833	0,030 *		0,071		
aPTT ¹⁾	0,962	0,937	0,254		1,000	0,202		0,786		
APACHE II	0,601	0,371			0,267					
SOFA	0,740	0,573	0,008 *		0,383	0,030 *		0,036 *		
SAPS II	0,669	0,469	0,040 *		0,267	0,149		0,036 *		
GCS	0,601	0,371	0,019 *	0,001 *	0,183	0,073	0,008 *	0,036 *	0,004 *	0,566
Alter	0,601	0,371	0,013 *	0,001 *	0,183	0,010 *	0,008 *	0,143	0,004 *	0,001 *

KW-Test: Kruskal-Wallis-Test

U-Test: Mann-Whitney-U-Test

¹⁾ Einheiten: siehe Tabelle 4, Seite 38

*) Signifikanz $p \leq 0,05$

Zytotoxizitätstest, Zeitpunkt 0 h: Mittelwert und Standardabweichung

	1) ITS-S (n = 10)	2) ITS-S/ü (n = 7)	3) ITS-S/nü (n = 3)	4) ITS-KS (n = 5)	5) GP (n = 13)
Ethoxyresorufin ²⁾	5,005 ± 5,90	6,096 ± 6,83	2,459 ± 1,74	14,566 ± 3,49	15,694 ± 2,61
Mikroalbumin ²⁾	43,045 ± 41,42	47,149 ± 43,77	33,468 ± 42,16	87,290 ± 21,27	89,765 ± 34,52
XTT ²⁾	1,552 ± 0,583	1,395 ± 0,58	1,920 ± 0,49	1,788 ± 0,14	1,773 ± 0,37
LDH ²⁾	139,525 ± 69,58	151,071 ± 82,05	112,583 ± 5,92	186,20 ± 65,50	213,135 ± 43,10

Asymptotische Signifikanzen p (nach Kruskal-Wallis-Test)

	KW-Test 1)↔2)	KW-Test 1)↔3)	KW-Test 1)↔4)	KW-Test 1)↔5)	KW-Test 2)↔3)	KW-Test 2)↔4)	KW-Test 2)↔5)	KW-Test 3)↔4)	KW-Test 3)↔5)	KW-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,883	0,940	0,014 *	0,002 *	0,732	0,038 *	0,001 *	0,055	0,001 *	0,460
Mikroalbumin ²⁾	0,961	0,993	0,037 *	0,024 *	0,909	0,082	0,017 *	0,146	0,026 *	0,657
XTT ²⁾	0,524	0,314	0,713	0,781	0,138	0,650	0,597	0,468	0,518	0,657
LDH ²⁾	0,883	0,940	0,270	0,046 *	0,732	0,559	0,090	0,635	0,054	0,324

Exakte Signifikanzen p (nach Mann-Whitney-U-Test)

	U-Test 1)↔2)	U-Test 1)↔3)	U-Test 1)↔4)	U-Test 1)↔5)	U-Test 2)↔3)	U-Test 2)↔4)	U-Test 2)↔5)	U-Test 3)↔4)	U-Test 3)↔5)	U-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,887	0,811	0,013 *	0,001 *	0,833	0,048 *	0,006 *	0,036 *	0,004 *	0,503
Mikroalbumin ²⁾	0,962	0,937	0,040 *	0,012 *	1,000	0,073	0,024 *	0,143	0,146	0,703
XTT ²⁾	0,536	0,287	0,768	0,563	0,183	0,432	0,211	0,571	0,439	0,703
LDH ²⁾	0,887	0,811	0,310	0,015 *	0,833	0,530	0,135	0,250	0,004 *	0,336

Zytotoxizitätstest, Zeitpunkt 6 h: Mittelwert und Standardabweichung

	1) ITS-S (n = 10)	2) ITS-S/ü (n = 7)	3) ITS-S/nü (n = 3)	4) ITS-KS (n = 5)	5) GP (n = 13)
Ethoxyresorufin ²⁾	7,244 ± 7,41	10,282 ± 7,38	1,168 ± 0,32	14,566 ± 3,49	15,694 ± 2,61
Mikroalbumin ²⁾	46,523 ± 45,91	50,838 ± 48,43	37,893 ± 48,99	87,290 ± 21,27	89,765 ± 34,52
XTT ²⁾	1,549 ± 0,50	1,457 ± 0,49	1,732 ± 0,55	1,788 ± 0,14	1,773 ± 0,37
LDH ²⁾	139,333 ± 85,54	169,0 ± 89,86	80,0 ± 34,07	186,20 ± 65,50	213,135 ± 43,10

Asymptotische Signifikanzen p (nach Kruskal-Wallis-Test)

	KW-Test 1)↔2)	KW-Test 1)↔3)	KW-Test 1)↔4)	KW-Test 1)↔5)	KW-Test 2)↔3)	KW-Test 2)↔4)	KW-Test 2)↔5)	KW-Test 3)↔4)	KW-Test 3)↔5)	KW-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,722	0,727	0,125	0,026 *	0,439	0,358	0,044 *	0,264	0,017 *	0,460
Mikroalbumin ²⁾	0,813	0,868	0,096	0,066	0,606	0,196	0,060	0,297	0,083	0,657
XTT ²⁾	0,636	0,567	0,205	0,273	0,302	0,280	0,203	0,386	0,309	0,657
LDH ²⁾	0,554	0,413	0,386	0,121	0,197	0,676	0,252	0,364	0,074	0,324

Exakte Signifikanzen p (nach Mann-Whitney-U-Test)

	U-Test 1)↔2)	U-Test 1)↔3)	U-Test 1)↔4)	U-Test 1)↔5)	U-Test 2)↔3)	U-Test 2)↔4)	U-Test 2)↔5)	U-Test 3)↔4)	U-Test 3)↔5)	U-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,776	0,600	0,147	0,007 *	0,548	0,537	0,087	0,036 *	0,004 *	0,503
Mikroalbumin ²⁾	0,864	0,727	0,112	0,030 *	0,714	0,177	0,058	0,250	0,189	0,703
XTT ²⁾	0,689	0,482	0,240	0,164	0,381	0,177	0,106	0,786	0,800	0,703
LDH ²⁾	0,607	0,373	0,438	0,051 *	0,262	1,000	0,416	0,071	0,004 *	0,336

KW-Test: Kruskal-Wallis-Test

U-Test: Mann-Whitney-U-Test

²⁾ Einheiten: siehe Abschnitt 4.2

*) Signifikanz p ≤ 0,05

Zytotoxizitätstest, Zeitpunkt 48 h: Mittelwert und Standardabweichung

	1) ITS-S (n = 10)	2) ITS-S/ü (n = 7)	3) ITS-S/nü (n = 3)	4) ITS-KS (n = 5)	5) GP (n = 13)
Ethoxyresorufin ²⁾	5,347 ± 7,51	7,326 ± 8,32	0,730 ± 0,56	14,566 ± 3,49	15,694 ± 2,61
Mikroalbumin ²⁾	39,110 ± 31,33	41,806 ± 29,30	32,817 ± 41,90	87,290 ± 21,27	89,765 ± 34,52
XTT ²⁾	1,704 ± 0,52	1,70 ± 0,56	1,713 ± 0,52	1,788 ± 0,14	1,773 ± 0,37
LDH ²⁾	136,90 ± 49,82	152,786 ± 47,47	99,833 ± 38,26	186,20 ± 65,50	213,135 ± 43,10

Asymptotische Signifikanzen p (nach Kruskal-Wallis-Test)

	KW-Test 1)↔2)	KW-Test 1)↔3)	KW-Test 1)↔4)	KW-Test 1)↔5)	KW-Test 2)↔3)	KW-Test 2)↔4)	KW-Test 2)↔5)	KW-Test 3)↔4)	KW-Test 3)↔5)	KW-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,524	0,314	0,066	0,010 *	0,138	0,173	0,012 *	0,093	0,004 *	0,460
Mikroalbumin ²⁾	0,732	0,715	0,014 *	0,009 *	0,425	0,025 *	0,005 *	0,051 *	0,008 *	0,657
XTT ²⁾	0,883	0,940	0,624	0,872	0,732	0,874	0,961	0,948	0,985	0,657
LDH ²⁾	0,590	0,436	0,178	0,008 *	0,210	0,378	0,009 *	0,286	0,005 *	0,324

Exakte Signifikanzen p (nach Mann-Whitney-U-Test)

	U-Test 1)↔2)	U-Test 1)↔3)	U-Test 1)↔4)	U-Test 1)↔5)	U-Test 2)↔3)	U-Test 2)↔4)	U-Test 2)↔5)	U-Test 3)↔4)	U-Test 3)↔5)	U-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,536	0,287	0,075	0,003 *	0,183	0,268	0,030 *	0,036 *	0,004 *	0,503
Mikroalbumin ²⁾	0,740	0,573	0,013 *	0,006 *	0,517	0,018 *	0,014 *	0,143	0,111	0,703
XTT ²⁾	0,887	0,811	0,679	0,738	0,833	0,755	0,817	0,786	0,800	0,703
LDH ²⁾	0,601	0,371	0,206	0,001 *	0,267	0,432	0,014 *	0,143	0,004 *	0,336

Zytotoxizitätstest, Zeitpunkt 54 h: Mittelwert und Standardabweichung

	1) ITS-S (n = 10)	2) ITS-S/ü (n = 7)	3) ITS-S/nü (n = 3)	4) ITS-KS (n = 5)	5) GP (n = 13)
Ethoxyresorufin ²⁾	6,477 ± 7,60	8,998 ± 7,87	0,594 ± 0,40	14,566 ± 3,49	15,694 ± 2,61
Mikroalbumin ²⁾	46,144 ± 45,35	55,777 ± 47,48	12,428 ± 2,37	87,290 ± 21,27	89,765 ± 34,52
XTT ²⁾	1,544 ± 0,28	1,633 ± 0,29	1,336 ± 0,15	1,788 ± 0,14	1,773 ± 0,37
LDH ²⁾	103,888 ± 51,92	118,339 ± 56,51	70,167 ± 10,77	186,20 ± 65,50	213,135 ± 43,10

Asymptotische Signifikanzen p (nach Kruskal-Wallis-Test)

	KW-Test 1)↔2)	KW-Test 1)↔3)	KW-Test 1)↔4)	KW-Test 1)↔5)	KW-Test 2)↔3)	KW-Test 2)↔4)	KW-Test 2)↔5)	KW-Test 3)↔4)	KW-Test 3)↔5)	KW-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,462	0,214	0,086	0,020 *	0,087	0,212	0,029 *	0,086	0,008 *	0,460
Mikroalbumin ²⁾	0,670	0,483	0,125	0,093	0,242	0,300	0,142	0,214	0,068	0,657
XTT ²⁾	0,590	0,436	0,142	0,187	0,210	0,363	0,306	0,201	0,159	0,657
LDH ²⁾	0,462	0,214	0,027 *	0,001 *	0,087	0,066	0,001 *	0,035 *	0,001 *	0,324

Exakte Signifikanzen p (nach Mann-Whitney-U-Test)

	U-Test 1)↔2)	U-Test 1)↔3)	U-Test 1)↔4)	U-Test 1)↔5)	U-Test 2)↔3)	U-Test 2)↔4)	U-Test 2)↔5)	U-Test 3)↔4)	U-Test 3)↔5)	U-Test 4)↔5)
Ethoxyresorufin ²⁾	0,475	0,217	0,099	0,006 *	0,117	0,343	0,067	0,036 *	0,004 *	0,503
Mikroalbumin ²⁾	0,681	0,436	0,147	0,043 *	0,333	0,343	0,183	0,095	0,019 *	0,703
XTT ²⁾	0,601	0,371	0,165	0,115	0,267	0,530	0,351	0,036 *	0,082	0,703
LDH ²⁾	0,475	0,217	0,028 *	0,001 *	0,117	0,106	0,002 *	0,036 *	0,004 *	0,336

KW-Test: Kruskal-Wallis-Test

U-Test: Mann-Whitney-U-Test

²⁾ Einheiten: siehe Abschnitt 4.2

*) Signifikanz p ≤ 0,05

Signifikanzen p im zeitlichen Verlauf und Vergleich (nach Friedman-Test)

	Fm-Test 0 h → 6 h	Fm-Test 6 h → 48 h	Fm-Test 48 h → 54 h	Fm-Test 0 h → 54 h	Fm-Test 0 h → 6 h → 48 h → 54 h
Ethoxyresorufin ²⁾					
ITS-S	0,739	0,739	0,527	0,527	0,615
ITS-S/ü	0,414	1,000	0,705	0,705	0,849
ITS-S/nü	0,083	0,564	0,564	0,083	0,072
Mikroalbumin ²⁾					
ITS-S	0,317	0,739	0,020 *	0,096	0,127
ITS-S/ü	0,414	1,000	0,705	0,257	0,362
ITS-S/nü	0,564	0,564	0,157	0,157	0,308
XTT ²⁾					
ITS-S	0,739	0,317	0,527	1,000	0,769
ITS-S/ü	0,414	0,414	0,705	0,705	0,334
ITS-S/nü	0,564	0,564	0,564	0,564	0,615
LDH ²⁾					
ITS-S	0,739	0,739	0,206	0,206	0,506
ITS-S/ü	1,000	1,000	0,257	0,705	0,706
ITS-S/nü	0,564	0,564	0,564	0,083	0,615

Fm-Test: Friedman-Test

²⁾ Einheiten: siehe Abschnitt 4.2

*) Asymptotische Signifikanzen auf dem 0,05-Niveau (2-seitig)

Signifikanzen p im zeitlichen Verlauf und paarweisen Vergleich (nach Wilcoxon-Test)

	Wc-Test 0 h → 6 h	Wc-Test 6 h → 48 h	Wc-Test 48 h → 54 h	Wc-Test 0 h → 54 h
Ethoxyresorufin ²⁾				
ITS-S	0,374	0,260	0,878	0,959
ITS-S/ü	0,116	0,345	0,735	0,398
ITS-S/nü	0,109	0,593	0,285	0,109
Mikroalbumin ²⁾				
ITS-S	0,314	0,314	0,066	0,260
ITS-S/ü	0,600	0,463	0,128	0,398
ITS-S/nü	0,285	0,285	0,180	0,180
XTT ²⁾				
ITS-S	0,859	0,515	0,241	0,959
ITS-S/ü	0,917	0,463	0,499	0,310
ITS-S/nü	0,285	1,000	0,285	0,285
LDH ²⁾				
ITS-S	0,953	0,594	0,059	0,074
ITS-S/ü	0,600	0,463	0,128	0,310
ITS-S/nü	0,285	0,593	0,276	0,109

Wc-Test: Wilcoxon-Test

²⁾ Einheiten: siehe Abschnitt 4.2

*) Asymptotische Signifikanzen auf dem 0,05-Niveau (2-seitig)

Studienbeginn: Zeitpunkt Tag 1 gegen 0 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾	
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,842 **	0,552	0,406	0,543	0,567	0,766 **	0,139	0,055	0,018	-0,024
	Signifikanz (2-seitig):		0,002	0,098	0,244	0,105	0,087	0,010	0,701	0,881	0,960	0,947
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,842 **	1,000	0,248	0,394	0,741 *	0,640 *	0,760 *	-0,115	-0,079	0,224	-0,170
	Signifikanz (2-seitig):	0,002		0,489	0,260	0,014	0,046	0,011	0,751	0,829	0,533	0,638
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,552	0,248	1,000	-0,006	0,340	0,500	0,365	0,103	-0,127	-0,055	0,438
	Signifikanz (2-seitig):	0,098	0,489		0,987	0,337	0,141	0,300	0,777	0,726	0,881	0,206
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,406	0,394	-0,006	1,000	0,414	0,293	0,529	-0,345	-0,261	0,115	0,322
	Signifikanz (2-seitig):	0,244	0,260	0,987		0,235	0,412	0,116	0,328	0,467	0,751	0,364
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,543	0,741 *	0,340	0,414	1,000	0,680 *	0,759 *	-0,395	-0,179	0,358	-0,084
	Signifikanz (2-seitig):	0,105	0,014	0,337	0,235		0,030	0,011	0,258	0,621	0,310	0,818
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,567	0,640 *	0,500	0,293	0,680 *	1,000	0,850 **	-0,476	-0,634 *	0,573	-0,070
	Signifikanz (2-seitig):	0,087	0,046	0,141	0,412	0,030		0,002	0,165	0,049	0,083	0,847
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,766 **	0,760 *	0,365	0,529	0,759 *	0,850 **	1,000	-0,347	-0,310	0,438	-0,247
	Signifikanz (2-seitig):	0,010	0,011	0,300	0,116	0,011	0,002		0,327	0,383	0,206	0,492
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,139	-0,115	0,103	-0,345	-0,395	-0,476	-0,347	1,000	0,621	-0,794 **	0,541
	Signifikanz (2-seitig):	0,701	0,751	0,777	0,328	0,258	0,165	0,327		0,060	0,006	0,106
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,055	-0,079	-0,127	-0,261	-0,179	-0,634 *	-0,310	0,612	1,000	-0,636 *	0,280
	Signifikanz (2-seitig):	0,881	0,829	0,726	0,467	0,621	0,049	0,383	0,060		0,048	0,434
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,018	0,224	-0,055	0,115	0,358	0,573	0,438	-0,794 **	-0,636 *	1,000	-0,474
	Signifikanz (2-seitig):	0,960	0,533	0,881	0,751	0,310	0,083	0,206	0,006	0,048		0,166
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,024	-0,170	0,438	-0,322	-0,084	-0,070	-0,247	0,541	0,280	-0,474	1,000
	Signifikanz (2-seitig):	0,947	0,638	0,206	0,364	0,818	0,847	0,492	0,106	0,434	0,166	

Studienbeginn: Tag 1 gegen Zeitpunkt 6 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)		ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,842 **	0,552	0,406	0,543	0,567	0,766 **	-0,400	0,050	0,067	0,133
	Signifikanz (2-seitig):		0,002	0,098	0,244	0,105	0,087	0,010	0,286	0,898	0,865	0,732
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,842 **	1,000	0,248	0,394	0,741 *	0,640 *	0,760 *	-0,400	-0,100	-0,217	0,250
	Signifikanz (2-seitig):	0,002		0,489	0,260	0,014	0,046	0,011	0,286	0,798	0,576	0,516
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,552	0,248	1,000	-0,006	0,340	0,500	0,365	-0,600	-0,233	0,133	-0,400
	Signifikanz (2-seitig):	0,098	0,489		0,987	0,337	0,141	0,300	0,088	0,546	0,732	0,286
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,406	0,394	-0,006	1,000	0,414	0,293	0,529	-0,133	-0,250	0,633	0,183
	Signifikanz (2-seitig):	0,244	0,260	0,987		0,235	0,412	0,116	0,732	0,516	0,067	0,637
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,543	0,741 *	0,340	0,414	1,000	0,680 *	0,759 *	-0,727 *	-0,718 *	0,197	-0,214
	Signifikanz (2-seitig):	0,105	0,014	0,337	0,235		0,030	0,011	0,027	0,029	0,612	0,581
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,567	0,640 *	0,500	0,293	0,680 *	1,000	0,850 **	-0,711 *	-0,485	-0,067	-0,293
	Signifikanz (2-seitig):	0,087	0,046	0,141	0,412	0,030		0,002	0,032	0,185	0,864	0,444
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,766 **	0,760 *	0,365	0,529	0,759 *	0,850 **	1,000	-0,644	-0,435	0,226	-0,259
	Signifikanz (2-seitig):	0,010	0,011	0,300	0,116	0,011	0,002		0,061	0,242	0,559	0,500
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,400	-0,400	-0,600	-0,133	-0,727 *	-0,711 *	-0,644	1,000	0,767 *	-0,333	0,500
	Signifikanz (2-seitig):	0,286	0,286	0,088	0,732	0,027	0,032	0,066		0,016	0,381	0,170
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,050	-0,100	-0,233	-0,250	-0,718 *	-0,485	-0,435	0,767 *	1,000	-0,517	0,317
	Signifikanz (2-seitig):	0,898	0,798	0,546	0,516	0,029	0,185	0,242	0,016		0,154	0,406
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,067	-0,217	0,133	0,633	0,197	-0,067	0,226	-0,333	-0,517	1,000	-0,167
	Signifikanz (2-seitig):	0,865	0,576	0,732	0,067	0,612	0,864	0,559	0,381	0,154		0,668
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,133	0,250	-0,400	0,183	-0,214	-0,293	-0,259	0,500	0,317	-0,167	1,000
	Signifikanz (2-seitig):	0,732	0,516	0,286	0,637	0,581	0,444	0,500	0,170	0,406	0,668	

Studienbeginn: Tag 1 gegen Zeitpunkt 48 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾	
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,842 **	0,552	0,406	0,543	0,567	0,766 *	0,479	0,212	0,055	-0,406
	Signifikanz (2-seitig):		0,002	0,098	0,244	0,105	0,087	0,010	0,162	0,556	0,881	0,244
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,842 **	1,000	0,248	0,394	0,741 *	0,640 *	0,760 *	0,152	0,127	0,212	-0,782 **
	Signifikanz (2-seitig):	0,002		0,489	0,260	0,014	0,014	0,011	0,676	0,726	0,556	0,008
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,552	0,248	1,000	-0,006	0,340	0,500	0,365	0,370	-0,200	-0,115	0,115
	Signifikanz (2-seitig):	0,098	0,489		0,987	0,337	0,141	0,300	0,293	0,580	0,751	0,751
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,406	0,394	-0,006	1,000	0,414	0,293	0,529	-0,006	0,127	0,333	-0,442
	Signifikanz (2-seitig):	0,244	0,260	0,987		0,235	0,412	0,116	0,987	0,726	0,347	0,200
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,543	0,741 *	0,340	0,414	1,000	0,680 *	0,759 *	-0,414	-0,167	0,167	-0,796 **
	Signifikanz (2-seitig):	0,105	0,014	0,337	0,235		0,030	0,011	0,235	0,645	0,645	0,006
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,567	0,640 *	0,500	0,293	0,680 *	1,000	0,850 **	0,043	-0,585	0,512	-0,598
	Signifikanz (2-seitig):	0,087	0,046	0,141	0,412	0,030		0,002	0,907	0,075	0,130	0,068
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,766 **	0,760 *	0,365	0,529	0,759 *	0,850 **	1,000	0,018	-0,274	0,383	-0,650 *
	Signifikanz (2-seitig):	0,010	0,011	0,300	0,116	0,011	0,002		0,960	0,444	0,275	0,042
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,479	0,152	0,370	-0,006	-0,414	0,043	0,018	1,000	0,200	0,042	0,321
	Signifikanz (2-seitig):	0,162	0,676	0,293	0,987	0,235	0,907	0,960		0,580	0,907	0,365
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,212	0,127	-0,200	0,127	-0,167	-0,585	-0,274	0,200	1,000	-0,621	0,164
	Signifikanz (2-seitig):	0,556	0,726	0,580	0,726	0,645	0,075	0,444	0,580		0,060	0,651
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,055	0,212	-0,115	0,333	0,167	0,512	0,383	0,042	-0,612	1,000	-0,527
	Signifikanz (2-seitig):	0,881	0,556	0,751	0,347	0,645	0,130	0,275	0,907	0,060		0,117
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,406	-0,782 **	0,115	-0,442	-0,796 **	-0,598	-0,650 *	0,321	0,164	-0,527	1,000
	Signifikanz (2-seitig):	0,244	0,008	0,751	0,200	0,006	0,068	0,042	0,365	0,651	0,117	

Studienbeginn: Tag 1 gegen Zeitpunkt 54 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾	
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,842 **	0,552	0,406	0,543	0,567	0,766 **	0,091	0,233	-0,273	0,176
	Signifikanz (2-seitig):		0,002	0,098	0,244	0,105	0,087	0,010	0,803	0,546	0,446	0,627
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,842 **	1,000	0,248	0,394	0,741 *	0,640 *	0,760 *	-0,212	-0,067	-0,103	-0,309
	Signifikanz (2-seitig):	0,002		0,489	0,260	0,014	0,046	0,011	0,556	0,865	0,777	0,385
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,552	0,248	1,000	-0,006	0,340	0,500	0,365	0,139	0,367	-0,406	0,285
	Signifikanz (2-seitig):	0,098	0,489		0,987	0,337	0,141	0,300	0,701	0,332	0,332	0,425
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,406	0,394	-0,006	1,000	0,414	0,293	0,529	-0,385	-0,400	0,455	0,115
	Signifikanz (2-seitig):	0,244	0,260	0,987		0,235	0,412	0,116	0,310	0,286	0,187	0,751
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,543	0,741 *	0,340	0,414	1,000	0,680 *	0,759 *	-0,673 *	-0,359	0,043	-0,549
	Signifikanz (2-seitig):	0,105	0,014	0,337	0,235		0,030	0,011	0,033	0,343	0,906	0,100
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,567	0,640 *	0,500	0,293	0,680 *	1,000	0,850 **	-0,390	-0,402	-0,317	-0,409
	Signifikanz (2-seitig):	0,087	0,046	0,141	0,412	0,030		0,002	0,265	0,284	0,372	0,241
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,766 **	0,760 *	0,365	0,529	0,759 *	0,850 **	1,000	-0,383	-0,435	-0,176	-0,249
	Signifikanz (2-seitig):	0,010	0,011	0,300	0,116	0,011	0,002		0,275	0,242	0,626	0,487
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,091	-0,212	0,139	-0,358	-0,673 *	-0,390	-0,383	1,000	0,867 **	-0,152	0,648 *
	Signifikanz (2-seitig):	0,803	0,556	0,701	0,310	0,033	0,265	0,275		0,002	0,676	0,043
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,233	-0,067	0,367	-0,400	-0,356	-0,402	-0,435	0,867 **	1,000	-0,333	0,567
	Signifikanz (2-seitig):	0,546	0,865	0,332	0,286	0,343	0,284	0,242	0,002		0,381	0,112
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,273	-0,103	-0,406	0,455	0,043	-0,317	-0,176	-0,152	-0,333	1,000	0,006
	Signifikanz (2-seitig):	0,446	0,777	0,244	0,187	0,906	0,372	0,626	0,676	0,381		0,987
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,176	-0,309	0,285	0,115	-0,549	-0,409	-0,249	0,648 *	0,567	0,006	1,000
	Signifikanz (2-seitig):	0,627	0,385	0,425	0,751	0,100	0,241	0,487	0,043	0,112	0,987	

Studie: Tag 3 gegen Zeitpunkt 0 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾	
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,927 **	0,723 *	0,382	0,222	0,467	0,395	0,164	0,030	-0,030	-0,134
	Signifikanz (2-seitig):		0,001	0,018	0,276	0,537	0,174	0,258	0,651	0,934	0,934	0,713
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,927 **	1,000	0,772 **	0,139	0,284	0,370	0,304	0,188	0,091	0,006	0,030
	Signifikanz (2-seitig):	0,001		0,009	0,701	0,426	0,293	0,393	0,603	0,803	0,987	0,934
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,723 *	0,772 **	1,000	0,049	0,303	0,328	0,326	0,334	-0,152	-0,152	0,360
	Signifikanz (2-seitig):	0,018	0,009		0,894	0,394	0,354	0,358	0,345	0,675	0,675	0,307
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,382	0,139	0,049	1,000	-0,056	0,358	0,328	-0,370	-0,515	0,297	-0,316
	Signifikanz (2-seitig):	0,276	0,701	0,894		0,879	0,310	0,354	0,293	0,128	0,405	0,374
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,222	0,284	0,303	-0,056	1,000	0,784 **	0,762 *	-0,253	-0,062	0,519	0,105
	Signifikanz (2-seitig):	0,537	0,426	0,394	0,879		0,007	0,010	0,480	0,865	0,125	0,772
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,467	0,370	0,328	0,358	0,784 **	1,000	0,924 **	-0,467	-0,406	0,685 *	-0,328
	Signifikanz (2-seitig):	0,174	0,293	0,354	0,310	0,007		0,001	0,174	0,244	0,029	0,354
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,395	0,304	0,326	0,328	0,762 *	0,924 **	1,000	-0,535	-0,468	0,663 *	-0,329
	Signifikanz (2-seitig):	0,258	0,393	0,358	0,354	0,010	0,001		0,111	0,172	0,037	0,353
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,164	0,188	0,334	-0,370	-0,253	-0,467	-0,535	1,000	0,612	-0,794 **	0,541
	Signifikanz (2-seitig):	0,651	0,603	0,345	0,293	0,480	0,174	0,111		0,060	0,006	0,106
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,030	0,091	-0,152	-0,515	-0,062	-0,406	-0,468	0,612	1,000	-0,636 *	0,280
	Signifikanz (2-seitig):	0,934	0,803	0,675	0,128	0,865	0,244	0,172	0,060		0,048	0,434
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,030	0,006	-0,152	0,297	0,519	0,685 *	0,663 *	-0,794 **	-0,636	1,000	-0,474
	Signifikanz (2-seitig):	0,934	0,987	0,675	0,405	0,125	0,029	0,037	0,006	0,048		0,166
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,134	0,030	0,360	-0,316	0,105	-0,328	-0,329	0,541	0,280	-0,474	1,000
	Signifikanz (2-seitig):	0,713	0,934	0,307	0,374	0,772	0,354	0,353	0,106	0,434	0,166	

Studie: Tag 3 gegen Zeitpunkt 6 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾	
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,927 **	0,723 *	0,382	0,222	0,467	0,395	-0,333	0,067	0,050	0,200
	Signifikanz (2-seitig):		0,001	0,018	0,276	0,537	0,174	0,258	0,381	0,865	0,898	0,606
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,927 **	1,000	0,772 **	0,139	0,284	0,370	0,304	-0,433	0,017	-0,083	0,233
	Signifikanz (2-seitig):	0,001		0,009	0,701	0,426	0,293	0,393	0,244	0,966	0,831	0,546
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,723 *	0,772 **	1,000	0,049	0,303	0,328	0,326	-0,251	0,201	-0,393	-0,067
	Signifikanz (2-seitig):	0,018	0,009		0,894	0,394	0,354	0,358	0,515	0,604	0,295	0,864
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,382	0,139	0,049	1,000	-0,056	0,358	0,328	-0,217	-0,183	0,483	0,017
	Signifikanz (2-seitig):	0,276	0,701	0,894		0,879	0,310	0,354	0,576	0,637	0,187	0,966
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,222	0,284	0,303	-0,056	1,000	0,784 **	0,762 *	-0,613	-0,392	-0,221	-0,315
	Signifikanz (2-seitig):	0,537	0,426	0,394	0,879		0,007	0,010	0,079	0,297	0,567	0,409
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,467	0,370	0,328	0,358	0,784 **	1,000	0,924 **	-0,733 *	-0,500	0,067	-0,400
	Signifikanz (2-seitig):	0,174	0,293	0,354	0,310	0,007		0,001	0,025	0,170	0,865	0,286
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,395	0,304	0,326	0,328	0,762 *	0,924 **	1,000	-0,544	-0,418	-0,159	-0,184
	Signifikanz (2-seitig):	0,258	0,393	0,358	0,354	0,010	0,001		0,130	0,262	0,683	0,635
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,333	-0,433	-0,251	-0,217	-0,613	-0,733 *	-0,544	1,000	0,767 *	-0,333	0,500
	Signifikanz (2-seitig):	0,381	0,244	0,515	0,576	0,079	0,025	0,130		0,016	0,381	0,170
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,067	0,017	0,201	-0,183	-0,392	-0,500	-0,418	0,767 *	1,000	-0,517	0,317
	Signifikanz (2-seitig):	0,865	0,966	0,604	0,637	0,297	0,170	0,262	0,016		0,154	0,406
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,050	-0,083	-0,393	0,483	-0,221	0,067	-0,159	-0,333	-0,517	1,000	-0,167
	Signifikanz (2-seitig):	0,898	0,831	0,295	0,187	0,567	0,865	0,683	0,381	0,154		0,668
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,200	0,233	-0,067	0,017	-0,315	-0,400	-0,184	0,500	0,317	-0,167	1,000
	Signifikanz (2-seitig):	0,606	0,546	0,864	0,966	0,409	0,286	0,635	0,170	0,406	0,668	

Studie: Tag 3 gegen Zeitpunkt 48 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾	
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,927 **	0,723 *	0,382	0,222	0,467	0,395	0,673 *	0,164	0,103	-0,261
	Signifikanz(2-seitig):		0,001	0,018	0,276	0,537	0,174	0,258	0,033	0,651	0,777	0,467
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,927 **	1,000	0,772 **	0,139	0,284	0,370	0,304	0,673 *	0,176	0,067	-0,224
	Signifikanz(2-seitig):	0,001		0,009	0,701	0,426	0,293	0,393	0,033	0,627	0,855	0,533
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,723 *	0,772 **	1,000	0,049	0,303	0,328	0,326	0,535	0,036	-0,146	-0,176
	Signifikanz(2-seitig):	0,018	0,009		0,894	0,394	0,354	0,358	0,111	0,920	0,688	0,626
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,382	0,139	0,049	1,000	-0,056	0,358	0,328	0,297	-0,164	0,576	-0,236
	Signifikanz(2-seitig):	0,276	0,701	0,894		0,879	0,310	0,354	0,405	0,651	0,082	0,511
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,222	0,284	0,303	-0,056	1,000	0,784 **	0,762 *	-0,364	-0,191	0,191	-0,654 *
	Signifikanz(2-seitig):	0,537	0,426	0,394	0,879		0,007	0,010	0,301	0,596	0,596	0,040
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,467	0,370	0,328	0,358	0,784 **	1,000	0,924 **	-0,127	-0,479	0,527	-0,697 *
	Signifikanz(2-seitig):	0,174	0,293	0,354	0,310	0,007		0,001	0,726	0,162	0,117	0,025
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,395	0,304	0,326	0,328	0,762 *	0,924 **	1,000	-0,140	-0,553	0,553	-0,717 *
	Signifikanz(2-seitig):	0,258	0,393	0,358	0,354	0,010	0,001		0,700	0,097	0,097	0,020
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,673 *	0,673 *	0,535	0,297	-0,364	-0,127	-0,140	1,000	0,200	0,042	0,321
	Signifikanz(2-seitig):	0,033	0,033	0,111	0,405	0,301	0,726	0,700		0,580	0,907	0,365
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,164	0,176	0,036	-0,164	-0,191	-0,479	-0,553	0,200	1,000	-0,612	0,164
	Signifikanz(2-seitig):	0,651	0,627	0,920	0,651	0,596	0,162	0,097	0,580		0,060	0,651
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,103	0,067	-0,146	0,576	0,191	0,527	0,553	0,042	-0,612	1,000	-0,527
	Signifikanz(2-seitig):	0,777	0,855	0,688	0,082	0,596	0,117	0,097	0,907	0,060		0,117
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,261	-0,224	-0,176	-0,236	-0,654 *	-0,697 *	-0,717 *	0,321	0,164	-0,527	1,000
	Signifikanz(2-seitig):	0,467	0,533	0,626	0,511	0,040	0,025	0,020	0,365	0,651	0,117	

Studie: Tag 3 gegen Zeitpunkt 54 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-S (n = 10)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾	
ALAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	1,000	0,927 **	0,723 *	0,382	0,222	0,467	0,395	0,309	0,183	-0,248	0,321
	Signifikanz (2-seitig):		0,001	0,018	0,276	0,537	0,174	0,258	0,385	0,637	0,489	0,365
ASAT ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,927 **	1,000	0,772 **	0,139	0,284	0,370	0,304	0,358	0,350	-0,297	0,297
	Signifikanz (2-seitig):	0,001		0,009	0,701	0,426	0,293	0,393	0,310	0,356	0,405	0,405
Bilirubin ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,723 *	0,772 **	1,000	0,049	0,303	0,328	0,326	0,351	0,351	-0,620	0,049
	Signifikanz (2-seitig):	0,018	0,009		0,894	0,394	0,354	0,358	0,638	0,354	0,056	0,894
CrP ¹⁾	Korrelationskoeffizient:	0,382	0,139	0,049	1,000	-0,056	0,358	0,328	-0,103	-0,483	0,152	0,200
	Signifikanz (2-seitig):	0,276	0,701	0,894		0,879	0,310	0,354	0,777	0,187	0,676	0,580
APACHE II	Korrelationskoeffizient:	0,222	0,284	0,303	-0,056	1,000	0,784 **	0,762 *	-0,475	-0,255	-0,352	-0,673 *
	Signifikanz (2-seitig):	0,537	0,426	0,394	0,879		0,007	0,010	0,165	0,507	0,319	0,033
SOFA	Korrelationskoeffizient:	0,467	0,370	0,328	0,358	0,784 **	1,000	0,924 **	-0,503	-0,533	-0,261	-0,442
	Signifikanz (2-seitig):	0,174	0,293	0,354	0,310	0,007		0,001	0,138	0,139	0,467	0,200
SAPS II	Korrelationskoeffizient:	0,395	0,304	0,326	0,328	0,762 *	0,924 **	1,000	-0,413	-0,536	-0,207	-0,620
	Signifikanz (2-seitig):	0,258	0,393	0,358	0,354	0,010	0,001		0,235	0,137	0,567	0,056
Ethoxy-resorufin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,309	0,358	0,170	-0,103	-0,475	-0,503	-0,413	1,000	0,867 **	-0,152	0,648 *
	Signifikanz (2-seitig):	0,385	0,310	0,638	0,777	0,165	0,138	0,235		0,002	0,676	0,043
Mikro-albumin ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,183	0,350	0,351	-0,483	-0,255	-0,533	-0,536	0,867 **	1,000	-0,333	0,567
	Signifikanz (2-seitig):	0,637	0,356	0,354	0,187	0,507	0,139	0,137	0,002		0,381	0,112
XTT ²⁾	Korrelationskoeffizient:	-0,248	-0,297	-0,620	0,152	-0,352	-0,261	-0,207	-0,152	-0,333	1,000	0,006
	Signifikanz (2-seitig):	0,489	0,405	0,056	0,676	0,319	0,467	0,567	0,676	0,381		0,987
LDH ²⁾	Korrelationskoeffizient:	0,321	0,297	0,049	0,200	-0,673 *	-0,442	-0,620	0,648 *	0,567	0,006	1,000
	Signifikanz (2-seitig):	0,365	0,405	0,894	0,580	0,033	0,200	0,056	0,043	0,112	0,987	

Studienbeginn: Zeitpunkt 0 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

ITS-KS (n = 5)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	CrP ¹⁾	APACHE II	SOFA	SAPS II	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾
ALAT ¹⁾ Korrelationskoeffizient:	1,000	1,000 **	0,900 *	-0,800	-0,205	-0,667	-0,667	0,700	0,300	0,700	-0,500
			0,037	0,104	0,741	0,219	0,219	0,188	0,624	0,188	0,391
ASAT ¹⁾ Korrelationskoeffizient:	1,000 **	1,000	0,900 *	-0,800	-0,205	-0,667	-0,667	0,700	0,300	0,700	-0,500
			0,037	0,104	0,741	0,219	0,219	0,188	0,624	0,188	0,391
Bilirubin ¹⁾ Korrelationskoeffizient:	0,900 *	0,900 *	1,000	-0,900 *	-0,359	-0,667	-0,821	0,600	0,600	0,600	-0,300
	0,037	0,037		0,037	0,553	0,219	0,089	0,285	0,285	0,285	0,624
CrP ¹⁾ Korrelationskoeffizient:	-0,800	-0,800	-0,900 *	1,000	0,718	0,872	0,975 **	-0,300	-0,700	-0,800	0,100
	0,104	0,104	0,037		0,172	0,054	0,005	0,624	0,188	0,104	0,873
APACHE II Korrelationskoeffizient:	-0,205	-0,205	-0,359	0,718	1,000	0,763	0,816	0,359	-0,667	-0,667	-0,359
	0,741	0,741	0,553	0,172		0,133	0,092	0,553	0,219	0,219	0,553
SOFA Korrelationskoeffizient:	-0,667	-0,667	-0,667	0,872	0,763	1,000	0,816	0,051	-0,359	-0,975 **	-0,205
	0,219	0,219	0,219	0,054	0,133		0,092	0,935	0,553	0,005	0,741
SAPS II Korrelationskoeffizient:	-0,667	-0,667	-0,821	0,975 **	0,816	0,816	1,000	-0,205	-0,821	-0,718	0,051
	0,219	0,219	0,089	0,005	0,092	0,092		0,741	0,089	0,172	0,935
Ethoxy-resorufin ²⁾ Korrelationskoeffizient:	0,700	0,700	0,600	-0,300	0,359	0,051	-0,205	1,000	0,200	0,000	-0,900 *
	0,188	0,188	0,285	0,624	0,553	0,935	0,741		0,747	1,000	0,037
Mikro-albumin ²⁾ Korrelationskoeffizient:	0,300	0,300	0,600	-0,700	-0,667	-0,359	-0,821	0,200	1,000	0,200	-0,100
	0,624	0,624	0,285	0,188	0,219	0,553	0,089	0,747		0,747	0,873
XTT ²⁾ Korrelationskoeffizient:	0,700	0,700	0,600	-0,800	-0,667	-0,975 **	-0,718	0,000	0,200	1,000	0,100
	0,188	0,188	0,285	0,104	0,219	0,005	0,172	1,000	0,747		0,873
LDH ²⁾ Korrelationskoeffizient:	-0,500	-0,500	-0,300	0,100	-0,359	-0,205	0,051	-0,900 *	-0,100	0,100	1,000
	0,391	0,391	0,624	0,873	0,553	0,741	0,935	0,037	0,873	0,873	

Studienbeginn: Zeitpunkt 0 h: Nichtparametrische Korrelation ρ (nach Spearman-Test)

GP (n = 13)	ALAT ¹⁾	ASAT ¹⁾	Bilirubin ¹⁾	Ethoxyres ²⁾	Mikroalb ²⁾	XTT ²⁾	LDH ²⁾
ALAT ¹⁾ Korrelationskoeffizient: Signifikanz (2-seitig):	1,000	0,759 **	0,621 *	0,253	-0,143	0,148	-0,478
		0,003	0,024	0,405	0,642	0,629	0,098
ASAT ¹⁾ Korrelationskoeffizient: Signifikanz (2-seitig):	0,759 **	1,000	0,660 *	0,085	-0,187	-0,151	-0,396
	0,003		0,014	0,782	0,541	0,622	0,180
Bilirubin ¹⁾ Korrelationskoeffizient: Signifikanz (2-seitig):	0,621 *	0,660 *	1,000	0,357	-0,302	-0,049	-0,687 **
	0,024	0,014		0,231	0,316	0,873	0,010
Ethoxy- resorufin ²⁾ Korrelationskoeffizient: Signifikanz (2-seitig):	0,253	0,085	0,357	1,000	0,346	0,352	-0,286
	0,405	0,782	0,231		0,247	0,236	0,344
Mikro- albumin ²⁾ Korrelationskoeffizient: Signifikanz (2-seitig):	-0,143	-0,187	-0,302	0,346	1,000	0,209	0,187
	0,642	0,541	0,316	0,247		0,494	0,541
XTT ²⁾ Korrelationskoeffizient: Signifikanz (2-seitig):	0,148	-0,151	-0,049	0,352	0,209	1,000	-0,368
	0,629	0,622	0,873	0,239	0,494		0,216
LDH ²⁾ Korrelationskoeffizient: Signifikanz (2-seitig):	-0,478	-0,396	-0,687 **	-0,286	0,187	-0,368	1,000
	0,098	0,180	0,010	0,344	0,541	0,216	

¹⁾ Einheiten: siehe Tabelle 4, Seite 38

²⁾ Einheiten: siehe Abschnitt 4.2

** Die Korrelation ist auf dem 0,01-Niveau signifikant (zweiseitig)

* Die Korrelation ist auf dem 0,05-Niveau signifikant (zweiseitig)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung des Leberversagens; in Anlehnung an Bauer et al. [10].....	3
Abbildung 2: Bipolare Störung des unspezifischen Immunsystems bei Sepsis; in Anlehnung an Höflich und Volk [47]	10
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des EISS-Therapieverfahrens	21
Abbildung 4: Alle Messergebnisse des Ethoxyresorufin-Tests (in pmol/l) der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen (U-Test).....	42
Abbildung 5: Ethoxyresorufin-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Subgruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf. Keine statistische Signifikanz zu den einzelnen Messzeit- punkten oder im Verlauf (U-Test und Wilcoxon-Test).....	43
Abbildung 6: Alle Messergebnisse des Mikroalbumin-Tests (in mg/l) der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen (U-Test)	44
Abbildung 7: Mikroalbumin-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Subgruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf. Keine statistische Signifikanz zu den einzelnen Messzeitpunkten oder im Verlauf (U-Test und Wilcoxon-Test)	45
Abbildung 8: Alle Messergebnisse des LDH-Tests (in U/l) der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen (U-Test)	48
Abbildung 9: LDH-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Sub- gruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf Keine statistische Signifikanz zu den einzelnen Messzeitpunkten oder im Verlauf (U-Test und Wilcoxon-Test)	49
Abbildung 10: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der septischen Testgruppe vor einer EISS-Behandlung	50

Abbildung 11: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der septischen Testgruppe nach einer EISS-Behandlung	51
Abbildung 12: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der nicht-septischen Kontrollgruppe I.....	52
Abbildung 13: HepG2/C3A-Sensorzellen nach Inkubation, Live/Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit dem Plasma eines Patienten der gesunden Kontrollgruppe II.....	53
Abbildung 14: Signifikante negative mittlere Korrelation zwischen den SOFA-Score- und Mikroalbumin-Werten des Biosensors bei der septischen Testgruppe.....	56
Abbildung 15: Signifikante negative mittlere Korrelation zwischen den SAPS II-Score- und XTT-Werten des Biosensors bei der septischen Testgruppe.....	56
Abbildung 16: Signifikante mittlere Korrelation zwischen den Serum-ALAT- und Ethoxyresorufin-Werten des Biosensors bei der septischen Testgruppe.....	57
Abbildung 17: Signifikante negative sehr hohe Korrelation zwischen den SOFA-Score- und XTT-Werten des Biosensors bei der nicht-septischen Kontrollgruppe I.	57
Abbildung 18: Signifikante negative mittlere Korrelation zwischen den Serum-Bilirubin- und LDH-Werten des Biosensors bei der gesunden Kontrollgruppe II	58

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Definitionen der systemischen Infektionen	6
Tabelle 2:	Definitionen für die akute Dysfunktion einzelner Organsysteme nach Kriterien der PROWESS-Studie	7
Tabelle 3:	Patientencharakteristika, Krankheitsschwere, Vorerkrankungen und klinisches Outcome beider intensivpflichtiger Testgruppen.....	36
Tabelle 4:	Bei Studienbeginn (Behandlungstag 1 für die ITS-Gruppe): Demografische und klinische Charakteristika, Krankheitsschwere für die Studiengruppen (Mittelwert \pm Standardabweichung)	38
Tabelle 5:	Quelle der Infektion und Kulturergebnisse der septischen Testgruppe (n = 10)	39
Tabelle 6:	Organversagen der septischen Testgruppe (n = 10).....	40
Tabelle 7:	Alle Messergebnisse des XTT-Tests der septischen Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen	46
Tabelle 8:	XTT-Test unter der EISS-Therapie bei beiden septischen Subgruppen im direkten Vergleich und zeitlichen Verlauf.....	47
Tabelle 10:	Interpretation des Korrelationskoeffizienten Rho (ρ)	54

7.4 Abkürzungsverzeichnis

AAP	Azetaminophen; Paracetamol
ACCP	American College of Chest Physicians
ACLV	Akut-auf-Chronisches Leberversagen
ACT	Activated Clotting Time
ALAT	Alanin-Amino-Transferase
ALV	Akutes Leberversagen
AM	Aceton-Methylester
ANI	Akute Niereninsuffizienz
AP	Alkalische Phosphatase
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (Score)
APP	Akute-Phase-Proteine
aPTT	activated Partial Thromboplastin Time
ASA	American Society of Anaesthesiologists
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bioartificial Liver
BELS	Berlin Extracorporeal Liver Support System
BGA	Blutgasanalyse
bpm	beats per minute
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CrP	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrom P450
DGKC	Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie
DMI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin
dl	Deziliter

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EISS	Extracorporeal Immune Support System
ELAD	Extracorporeal Liver Assist Devices
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EROD	Ethoxyresorufin O-Deethylase
ESICM	European Society for Intensive Care Medicine
FKS	Fetales Kälber-Serum
g	Gramm
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
GCS	Glasgow Coma Scale (Score)
GpT/l	Gigapartikel pro Liter
h	Stunde
HBV	Hepatitis B-Virus
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HE	Hepatische Enzephalopathie
HELLP	Haemolysis, Elevated Liver Enzyme Levels, Low Platelet Count
HF	Herzfrequenz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICG	Indocyanine Green
IFN-γ	Interferon-gamma
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
ITS	Intensivstation
kg	Kilogramm

KT	Körpertemperatur
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LiMON	Liver Monitoring
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrome
MEGX	Monoethylglycinexylidid
MELS	Modular Extracorporeal Liver Support System
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mm ³	Kubikmillimeter
mmol	Millimol
MOV	Multiorganversagen
Mrd	Milliarden
MW	Mittelwert
n	number (Fallzahl)
NAD/NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form/reduzierte Form)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NI	Niereninsuffizienz
NO	Stickoxid
NYHA	New York Heart Association

p	Piko
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAP _{mittel}	Pulmonary Arterial Pressure (Mitteldruck)
Pat.	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCT	Procalcitonin
PDR	Plasma Disappearance Rate
PGE	Prostaglandin
PIRO	Prädisposition, Infektion, Reaktion, Organdysfunktion
pH	pulmonale Hypertonie
pmol	Pikomol
PROWESS	Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
s	Sekunde
S	Serum
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment (Score)
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
U/l	Unit pro Liter
U/min	Umdrehung pro Minute
XTT	Sodium 3'-[1-(Phenylaminocarbonyl)- 3,4-Tetrazolium]-bis (4-Methoxy-6-Nitro) Benzene Sulfonic Acid Hydrate

8. Literaturverzeichnis

- [1] Rifai K, Bahr MJ: Akutes Leberversagen. *Der Internist* 2003; 44: 585–598.
- [2] Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonca A, Cantraine F, Thijs L, Takala J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H, Willatts S: The uses of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. *Intensive Care Med* 1999; 25 (7): 686–696.
- [3] Kramer L, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz PG: Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients – A prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2007; 35 (4): 1099–1104.
- [4] Nickolaus B: Extrakorporale Detoxikation: Künstliche Leber vorgestellt. *Dtsch Ärzteblatt Int* 2003; 100 (1–2): 17.
- [5] Böker KH: Akutes Leberversagen. *Der Internist* 2001; 42: 554–563.
- [6] Lee WM: Acute liver failure. *N Engl J Med* 1993; 329: 1862–1872.
- [7] Hughes RD, Wendon J, Gimson AE: Acute liver failure. *Gut* 1991; 32 (Suppl): 86–91.
- [8] O’Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R: Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97: 439–445.
- [9] O’Grady JG, Williams R: Classification of acute liver failure. *Lancet* 1993; 342: 743–748.
- [10] Bauer M, Paxian M, Kortgen A: Akutes Leberversagen. Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie. *Der Anaesthesist* 2004; 53 (6): 511–530.
- [11] Jalan R, Williams R: Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif* 2002; 20 (3): 252–261.
- [12] Sen S, Mohensi S, Sjodin L, Cheshire L, Williams R, Bjornsson E, Jalan R: Baseline SOFA score and its lack of early improvement accurately predicts mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* 2004; 40 (1): 489 A.
- [13] Stauber R, Stadlbauer V, Struber G, Kaufmann P: Evaluation of four prognostic scores in patients with acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 2006; 44: 69–70.
- [14] Kimura S, Yoshioka T, Shibuya M, Sakano T, Tanaka R, Matsuyama S: Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival. *Crit Care Med* 2001; 29: 1159–1163.

- [15] Sakka SG, Reinhart K, Meier-Hellmann A: Prognostic value of the Indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients. *Chest* 2000; 122: 1715–1720.
- [16] Szabo G, Romics L Jr, Frenzl G: Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Clin Liver Dis* 2002; 6 (4): 1045–1066.
- [17] Dahn MS, Mitchell RA, Lange PM, Smitz SS, Jacobs LA: Hepatic metabolic response to injury and sepsis. *Surgery* 1995; 117: 520–530.
- [18] Dahn MS, Lange MP, Wilson RF, Jacobs LA, Mitchell RA: Hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption measurements in clinical sepsis. *Surgery* 1990; 107 (3): 295–301.
- [19] Dahn MS, Lange P, Lobdell K, Hans B, Jacobs LA, Mitchell RA: Splanchnic and total body oxygen consumption in septic and injured patients. *Surgery* 1987; 101 (1): 69–80.
- [20] Pastor CM, Suter PM: Hepatic hemodynamics and cell functions in human and experimental sepsis. *Anesth Analg* 1999; 89: 344–352.
- [21] Del Maestro RF: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1980; 492 (Suppl): 153–168.
- [22] Ming WJ, Bersani L, Mantovani A: Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987; 138 (5): 1469–1474.
- [23] Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX: Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997; 8: 80–85.
- [24] Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53: 957–978.
- [25] Trauner M, Nathanson MH, Rydberg SA, Koepfel TA, Gartung C, Sessa WC, Boyer JL: Endotoxin impairs biliary and HCO₃ excretion and blocks the choleretic effects of nitric oxide in rat liver. *Hepatology* 1997; 25: 1184–1191.
- [26] Laschke MD, Thorlacius H, Jeppson B, Menger MD: Septisch bedingte Cholestase wird durch eine leukozytäre Infiltration der Leber verursacht. *Chirurg Forum* 2006; 35: 7–8.
- [27] Gottlieb ME, Stratton HH, Newell JC, Shah DM: Indocyanine green. Its use as an early indicator of hepatic dysfunction following injury in man. *Arch Surg* 1984; 119 (3): 264–268.

- [28] Bakker J, Grover R, McLuckie A, Holzapfel L, Andersson J, Lodato R, Watson D, Grossman S, Donaldson J, Takala J: Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-Methyl L arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: Results of a randomized double blind placebo controlled multicener study. *Crit Care Med* 2004; 32: 1–12.
- [29] Wang P, Ba ZF, Chaudry IH: Hepatic extraction of indocyanine green is depressed early in sepsis despite increased hepatic blood flow and cardiac output. *Arch Surg* 1991; 126: 219–224.
- [30] American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20 (6): 864–874.
- [31] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopes-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely ECJ Jr: Recombined human protein C worldwide evaluation in severe sepsis (PROWESS) study group. *N Engl J Med* 2001; 344: 699–709.
- [32] Kredel M, Brederlau J, Roewer N, Wunder C: Cholestase und Leberinsuffizienz beim Intensivpatienten. *Der Anaesthetist* 2008; 57 (12): 1172–1182.
- [33] Brienza N, Dalfino L, Cinnella G, Diele C, Bruno F, Fiore T: Jaundice in critical illness: promoting factors of a concealed reality. *Intensive Care Med* 2006; 32 (2): 267–274.
- [34] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2001; 31: 1250–1256.
- [35] Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J: Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 2005; 11 (3): 76–85.
- [36] Riedemann NC, Guo F, Ward PA: Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003; 9 (5): 517–524.
- [37] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101 (6): 1644–1655.
- [38] Danai P, Martin GS: Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7 (5): 329–334.
- [39] Annane D, Bellissant E, Cavillon JM: Septic shock. *Lancet* 2005; 365: 63–78.

- [40] Hebert PC, Drummond AJ, Singer J, Bernard GR, Russell JA: A simple multiple system organ failure scoring system predicts mortality of patients who have sepsis syndrome. *Chest* 1993; 104: 230–235.
- [41] Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24 (7): 1125–1128.
- [42] Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA: Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112 (1): 235–243.
- [43] Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, van den Berg AP, Tulleken JE, Kallenberg CG, The TH: The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med* 1999; 55 (3): 132–141.
- [44] Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885–891.
- [45] Volk HD, Reinke P, Docke WD: Clinical aspects: From systemic inflammation to immunoparalysis. *Chem Immunol* 2000; 74: 162–177.
- [46] Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138–150.
- [47] Höflich C, Volk HD: Immunmodulation in der Sepsis. *Der Chirurg* 2002; 73: 1100–1104.
- [48] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29 (7): 1303–1310.
- [49] Rangel-Frausto MS: The epidemiology of bacterial sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13 (2): 299–312.
- [50] Engel C, Brunkhorst FM, Löffler M, Reinhart K: Diagnose und Epidemiologie der Sepsis; *Dtsch Ärzteblatt Int* 2007; 18 (7–8): 414–417.
- [51] Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H: Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econom* 2002; 3: 77–82.
- [52] Cammann K: Biosensors based on ion-selective electrodes. *Fresenius J Anal Chem* 1977; 287: 1–9.
- [53] Turner APF, Karube I, Wilson GS: Biosensors: Fundamentals and applications. 1. Edition, Oxford University Press New York 1987 (ISBN 0198547242).
- [54] Clark LC Jr, Lyons C: Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* 1962; 102: 29–45.

- [55] eBiochip Systems GmbH; <http://www.ebiochip.com/> (Datum der letzten Sichtung: 25.06.2010).
- [56] Jürgen B, Barken K, Tobisch S, Wümpelmann M, Pioch D, Hecker M, Schweder T: Application of an Electrical DNA Chip for the Expression Analysis of Bioprocess-Relevant Genes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 2005; 92 (3): 299–307.
- [57] Patent: Schweder T, Hecker M, Jürgen B, Voigt B, M Feesche J, Brewes R, Maurer KH: DNA Chips used for bioprocess control. WO/2004/027092; PCT/EP2003/009979; DE10242433.
- [58] Bionas GmbH; <http://www.bionas.de/> (Datum der letzten Sichtung: 25.06.2010).
- [59] Primacyt Cell Culture Technologie GmbH; <http://www.primacyt.de/> (Datum der letzten Sichtung: 25.06.2010).
- [60] Thedinga E, Ullrich A, Drechsler S, Niendorf R, Kob A, Runge D, Keuer A, Freund I, Lehmann M, Ehret R: In vitro system for the prediction of hepatotoxic effects in primary hepatocytes. *ALTEX* 2007; 24 (1): 22–34.
- [61] Ullrich A, Berg C, Hengstler JG, Runge D: Use of a standardised and validated long-term human hepatocyte culture system for repetitive analyses of drugs: repeated administrations of acetaminophen reduces albumin and urea secretion. *ALTEX* 2007; 24 (1): 35–40.
- [62] Gross GW, Rhoades BK: The use of neuronal networks on multielectrode arrays as Biosensors. *Biosens Bioelectron* 1995; 10 (6–7): 553–567.
- [63] Streit J, Tscherter A, Heuschkel MO, Renaud P: The generation of rhythmic activity in dissociated cultures of rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 191–202.
- [64] Pancrazio JJ, Gray SA, Shubin YS, Kulagina N, Cuttino DS, Shaffer KM, Eisemann K, Curran A, Zim B, Gross GW, O’Shaughnessy TJ: A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. *Biosens Bioelectron* 2003; 18 (11): 1339–1347.
- [65] Gross GW: Internal dynamics of randomized mammalian neuronal networks in culture. In: DA Stenger, TM McKenna (eds.): *Enabling technologies for cultured neural networks*. Academic Press New York 1994 (ISBN 0126659702).
- [66] Loock J, Stange J, Mitzner SR, Schmidt R, Gramowski A, Schiffmann D, Weiss DG, Keefer EW, Gross GW: Influence of albumin dialysis (MARS) on neuronal network activity in vitro – early results. *Z Gastroenterol* 2001; 39 (Suppl): 28–32.

- [67] Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG: Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384 (2): 222–232.
- [68] Nathan C, Shiloh MU: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (16): 8841–8848.
- [69] Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ: Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77 (5): 2933–2940.
- [70] Collins SJ: The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987; 70 (5): 1233–1244.
- [71] Patent: Mitzner SR, Altrichter J, Dollmantel HJ, Sulz J: Sepsis diagnostic test. WO/2006/000570; PCT/EP 2005/052950.
- [72] Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW: Isolated hepatocytes-past, present and future. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13 (4–5): 223–233.
- [73] Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Ponsoda X, Bort R: The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13: 331–338.
- [74] Guillouzo A: Liver cell models in in-vitro toxicology. *Environ Health Perspect* 1998; 106 (2): 511–532.
- [75] Morel F, Langouet S, Maheo K, Guillouzo A: The use of primary hepatocyte cultures for the evaluation of chemoprotective agents. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13: 323–329.
- [76] Guillouzo A, Morel F, Langouet S, Maheo K, Rissel M: Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. *J Hepatol* 1997; 26 (2): 73–80.
- [77] Knowles BB, Aden DP: Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof and uses therefor. 1983 US-Patent 4, 393, 133.
- [78] Vesey DA, Cunningham JM, Selden AC, Woodman AC, Hodgson HJ: Dimethyl sulphoxide induces a reduced growth rate, altered cell morphology and increased epidermal-growth-factor binding in HepG2 cells. *Biochem J* 1991; 277: 773–777.

- [79] Doostdar H, Burke MD, Melvin WT, Grant MH: The effects of dimethylsulphoxide and 5-aminolaevulinic acid on the activities of cytochrome P450-dependent mixed function oxidase and UDP- glucuronosyl transferase activities in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1307–1313.
- [80] Stange J, Mitzner SR, Strauss M, Fischer U, Lindemann S, Peters E, Holtz M, Drewelow B, Schmidt R: Primary or established liver cells for a hybrid liver? Comparison of metabolic features. *ASAIO J* 1995; 41: 310–315.
- [81] Wang L, Sun J, Li L, Mears D, Horvat M, Sheil AG: Comparison of porcine hepatocytes with human hepatoma (C3A) cells for use in a bioartificial liver support system. *Cell Transplant* 1998; 7: 459–468.
- [82] Dehn PF, White CM, Conners DE, Shipkey G, Cumbo TA: Characterization of the human hepatocellular Carcinoma (HepG2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2004; 40 (5–6): 172–182.
- [83] Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH: The hepatic extracorporeal liver assistent device: Initial clinical experience. *Artif Organs* 1994; 18: 390–396.
- [84] Patent: Sauer M: The use of human hepatocytes to determine liver function and liver regeneration. WO/2007/090633; PCT/EP 2007/004047; DE/2006 102006005526.
- [85] Trachsler J, Ambühl PM: Chronische Niereninsuffizienz: Aktueller Stand der Dialyseverfahren. *Schweiz Med Forum* 2009; 9 (3): 40–44.
- [86] Horn N, Unger J, Rossaint R: Extrakorporale Leberunterstützungsverfahren in der Therapie des akuten Leberversagens. Eine Standortbestimmung. *Der Anaesthesist* 1999; 48 (6): 387–394.
- [87] Flendrig LM, la Soe JW, Jorning GG, Steenbeek A, Karlsen OT, Bovee WM, Ladiges NC, te Velde AA, Chamuleau RA: 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: 1379–1392.
- [88] van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Scala D, Scala S, Zeuli L, Di Nicuolo G, Amoroso P, Calise F, Chamuleau RA: Bridging a patient with acute liver failure to liver transplantation by the AMC-bioartificial liver. *Cell Transplant* 2003; 12 (6): 563–568.
- [89] Rozga J, Holzman MD, Ro MS, Griffin DW, Neuzil DF, Giorgio T, Moscioni AD, Demetriou AA: Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg* 1993; 217: 502–511.

- [90] Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA: Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004; 239 (5): 660–670.
- [91] Gerlach JC: Development of a hybrid liver support system: a review. *Int J Artif Organs* 1996; 19 (11): 645–654.
- [92] Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K, Pascher A, Gruenwald A, Pless G, Irgang M, Kraemer M, Puhl G, Frank J, Muller AR, Steinmuller T, Denner J, Neuhaus P, Gerlach JC: Clinical extracorporeal hybrid liver support: phase-I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* 2003; 10 (5): 460–469.
- [93] Sauer IM, Zeillinger K, Obermayer N, Pless G, Grünwald A, Pascher A, Mieder T, Roth S, Goetz M, Kardassis D, Mas A, Neuhaus P, Gerlach JP: Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support – a preliminary report. *Int J Artif Organs* 2002; 25 (10): 1001–1005.
- [94] Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R: Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24 (6): 1446–1451.
- [95] Millis JM, Cronin DC, Johnson R, Conjeevaram H, Conlin C, Trevino S, Maguire P: Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation* 2002; 74: 1735–1746.
- [96] Vital Therapies Inc. San Diego USA; <http://www.vitaltherapies.com/> (Datum der letzten Sichtung: 25.06.2010).
- [97] Mitzner SR, Freytag J, Sauer M, Kleinfeldt T, Altrichter J, Klohr S, Koball S, Stange J, Ringel B, Nebe B, Schmidt H, Podbielski A, Noeldge-Schomburg G, Schmidt R: Use of human preconditioned phagocytes for extracorporeal immune support: introduction of a concept. *Ther Apher* 2001; 5 (5): 423–432.
- [98] Sauer M, Altrichter J, Kreutzer HJ, Lögters T, Scholz M, Nöldge-Schomburg G, Schmidt R, Mitzner SR: Extracorporeal cell therapy with granulocytes in a pig model of Gram-positive sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37 (2): 606–613.
- [99] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*. 2008; 34 (1): 17–60.

- [100] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE: APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13 (10): 818–829.
- [101] Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: The SOFA (Sepsis-Related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22 (7): 707–710.
- [102] Le Gall JR, Loirat P, Alperovitek A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D, Mercier P, Thomas R, Villers D: A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med* 1984; 12 (11): 975–977.
- [103] Teasdale G, Jennett B: Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2 (7872): 81–84.
- [104] ATCC Cell Lines and Hybridomas; <http://www.atcc.org/> (Datum der letzten Sichtung: 25.06.2010).
- [105] Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ: Isolated hepatocytes, preparation, properties and applications (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology). 1. Edition, Elsevier Publishing Company Amsterdam 1991 (ISBN 1 0444813020).
- [106] Belinsky SA, Poop JA, Kaufman FC, Thurman RG: Trypan Blue uptake as a new method to study hepatotoxicity in the perfused liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 230: 755–760.
- [107] Kelly JH, Sussman NL: A fluorescent cell-based assay for cytochrome P-450 isozyme 1A2 induction and inhibition. *J Biomol Screen* 2000; 5 (4): 249–253.
- [108] Donato MT, Gómez-Lechón MJ, Castell JV: A microassay for measuring cytochrome P450 1A1 and P450 2B1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 1993; 213: 29–33.
- [109] Wakabayashi M, Fishman WH: The comparative ability of beta-glucuronidase preparations (liver, *Escherichia coli*, *Helix pomatia* and *Patella vulgata*) to hydrolyze certain steroid glucosiduronic acids. *J Biol Chem* 1961; 236: 996–1001.
- [110] Roy AB: Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation (eds. Bernstein S, Solomon S). Springer Verlag New York 1970 (LCCN 76501174).
- [111] Lescoat G, Desvergne B, Loreal O, Padeloup N, Deugnier Y, Bourel M, Brissot P: Modulation of albumin secretion by ornithine alpha-ketoglutarate in adult rat hepatocyte culture and a human hepatoma cell line (HepG2). *Ann Nutr Metab* 1989; 33 (5): 252–260.

- [112] Helsing K: The effects of different polymers for enhancement of the antigen-antibody reaction as measured with nephelometry. In: Peeters H (ed.): *Protides of the Biological Fluids*. Oxford Pergamon Press 1973 (ISBN 0080199291).
- [113] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48 (17): 4827–4833.
- [114] Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 1991; 142 (2): 257–265.
- [115] Lu JH, Chiu YT, Sung HW, Hwang B, Chong CK, Chen SP, Mao SJ, Yang PZ, Chang Y: XTT-colorimetric assay as a marker of viability in cryoprocessed cardiac valve: *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29 (4): 1189–1194.
- [116] Modriansky M, Ulrichova J, Bachleda P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Walterova D, Simanek V: Human hepatocyte – a model for toxicological studies. Functional and biochemical characterization. *Gen Physiol Biophys* 2000; 19 (2): 223–235.
- [117] Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie: *Z Klin Chem Klin Biochem* 1972; 10: 182.
- [118] Dong Z, Venkatachalam MA, Weinberg JM, Saikumar P, Patel Y: Protection of ATP-depleted cells by impermeant strychnine derivatives: implications for glycine cytoprotection. *Am J Pathol* 2001; 158 (3): 1021–1028.
- [119] Krentz H: *Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin*. 1. Auflage, Shaker Verlag Aachen 2005 (ISBN 3-8322-3979-0).
- [120] Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stüber F, Weiler N: Diagnose und Therapie der Sepsis: S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin. *Die Med Welt* 2006; 57 (1): 23–36.
- [121] Pirovino M, Meister F, Rubli E, Karlaganis G: Preserved cytosolic and synthetic liver function in jaundice of severe extrahepatic infection. *Gastroenterology* 1989; 96 (6): 1589–1595.
- [122] Igonin AA, Armstrong VW, Shipkova M, Kukes VG, Oellerich M: The monoethylglycineoxylidide (MEGX) test as a marker of hepatic dysfunction in septic patients with pneumonia. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38 (11): 1125–1128.

- [123] Fang MH, Ginsberg AL, Dobbins WO: Marked elevation in serum alkaline phosphatase activity as a manifestation of systemic infection. *Gastroenterology* 1980; 78 (3): 592–597.
- [124] Schwartz DB, Bone RC, Balk RA, Szidon JP: Hepatic dysfunction in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1989; 95 (4): 871–875.
- [125] PULSION Medical Systems, München, Deutschland. Zulassungsnummer: 1–25749; Oktober 2007.
- [126] Uusaro A, Ruokonen E, Takala J: Estimation of splanchnic blood flow by the Fick principle in man and problems in the use of indocyanine-green. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 106–112.
- [127] Ott P, Bass L, Keiding S: Hepatic ICG removal in the pig depends on plasma protein and hematocrit: evidence of sinusoidal binding disequilibrium and unstirred water layer effects. *Hepatology* 1997; 26: 679–690.
- [128] Lund M, Kang L, Tygstrup N, Wolkoff AW, Ott P: Effects of LPS on transport of indocyanine green and alanine uptake in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1999; 277: 91–100.
- [129] Chijiwa K, Mizuta A, Ueda J, Takamatsu Y, Nakamura K, Watanabe M, Kuroki S, Tanaka M: Relation of biliary bile acid output to hepatic adenosine triphosphate level and biliary indocyanine green excretion in humans. *World J Surg* 2002; 26: 457–461.
- [130] Beno DW, Uhing MR, Goto M, Chen Y, Jiyamapa-Serna VA, Kimura RE: Endotoxin-induced reduction in biliary indocyanine green excretion rate in a chronically catheterized rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 858–865.
- [131] Stehr A, Ploner F, Traeger K, Theisen M, Zuelke C, Radermacher P, Matejovic M: Plasma disappearance of indocyanine green: a marker for excretory liver function? *Intensive Care Med* 2005; 31 (12): 1719–1722.
- [132] Kapral C, Binder M, Buder R, Csillag C, Firlinger F, Gegenhuber A, Lenz K, Wewalka F, Überall B: Leberversagen bei Sepsis und Multiorganversagen. *J Gastroenterol Hepatol Erkr* 2005; 3 (2), 7–12.
- [133] Benowitz NL, Meister W: Clinical pharmacokinetics of lignocaine. *Clin Pharmacokinet* 1978; 3 (3): 177–201.
- [134] Maynard ND, Bihari DJ, Dalton RN, Beale R, Smithies MN, Mason RC: Liver function and splanchnic ischemia in critically ill patients. *Chest* 1997; 111 (1): 180–187.

- [135] Gumucio JJ: Hepatocyte heterogeneity: the coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. *Hepatology* 1989; 9 (1): 154–160.
- [136] Bargetzi MJ, Aoyama T, Gonzalez FJ, Meyer UA: Lignocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450III_{A4}. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46 (5): 521–527.
- [137] Fukuda T, Kakiuchi Y, Miyabe M, Okubo N, Yaguchi Y, Kohda Y, Toyooka H: Plasma lidocaine, monoethylglycinexylidide, and glycinexylidide concentrations after epidural administration in geriatric patients. *Reg Anesth Pain Med* 2000; 25 (3): 268–273.
- [138] Reichel C, Wienkoop G, Nacke A, Spengler U: Monoethylglycinexylidide (MEGX)-Test. Ein Test zur Einschätzung der Prognose vor und nach Lebertransplantation. *Dtsch Med Wochenschr* 1995; 120 (6): 179–183.
- [139] Aden DP, Fogel A, Plotkin S: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282: 615–616.
- [140] Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G: Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived Cell line HepG2: Morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted protein. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25 (3): 267–275.
- [141] Knowels BB, Howe CC, Aden DP: Human hepatoblastoma cell line secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; 209: 497–499.
- [142] Nyberg SL, Remmel RP, Mann HJ, Peshwa MV, Hu WS, Cerra FB: Primary hepatocytes outperform HepG2 cells as source of biotransformation functions in a bioartificial liver. *Ann Surg* 1994; 220 (1): 59–67.
- [143] Doostar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH: The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived HepG2 cell line. *FEBS Letters* 1988; 241 (1–2): 15–18.
- [144] Burke MD, Mayer RT: Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal-Odealkylation which is preferentially inducible by 3-methyl-cholanthrene. *Drug Metab Dispos* 1974; 2 (6): 583–588.
- [145] Buhler DR, Wang-Buhler JL: Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp Biochem Physiol* 1998; 121 (1–3): 107–137.
- [146] Daly AK: Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17 (1): 27–41.

- [147] Cresteil T: Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications. *Food Addit Contam* 1998; 15: 45–51.
- [148] Payne, JF, Penrose WR: Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bull Environ Contam Tox* 1975; 14: 112–116.
- [149] Payne JF: Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine pollution. *Science* 1976; 191: 945–946.
- [150] Gibson GG, Skett P (ed.): *Introduction into drug metabolism*. 2. Edition, Blackie Academic and Professional London 1994 (ISBN 0748744444).
- [151] Schmitz HJ, Hagenmaier A, Hagenmaier H, Bock KW, Schrenk D: Potency of mixtures of polychlorinated biphenyls as inducers of dioxin receptor-regulated CYP1A activity in rat hepatocytes and H4IIE cells. *Toxicology* 1995; 99: 47–54.
- [152] Hylland K, Sandvik M, Utne Skåre J, Beyer J, Egaas E, Goksøyr A: Biomarkers in Flounder (*Platichthys flesus*): An evaluation of their use in pollution monitoring. *Mar Env Res* 1996; 42 (1–4): 223–227.
- [153] Thomas L (Hrsg.): Albumin. In: *Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 6. Auflage, TH-Books Frankfurt/Main 2005 (ISBN 3980521559).
- [154] Nussler AK, Wang A, Neuhaus P, Fischer J, Yuan J, Liu L, Zeilinger K, Gerlach J, Arnold PJ, Albrecht W: The suitability of hepatocyte culture models to study various aspects of drug metabolism. *ALTEX* 2001; 18 (2): 91–101.
- [155] Yuan J, Liu L, Shimada M, Wang A, Ruhnke M, Heeckt P, Müller AR, Nussler NC, Neuhaus P, Nussler A: Induction, expression and maintenance of cytochrome P450 isoforms in long-term cultures of primary human hepatocytes. *ALTEX* 2004; 21 (3): 3–11.
- [156] Mosman T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65 (1–2): 55–63.
- [157] Cory AH, Owen TC, Bartrop JA, Cory JG: Use of an aqueous soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991; 3: 207–212.
- [158] Carmicheal J, De Graff WG, Gazdar AF, Minna JD, Michell JB: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47: 936–942.
- [159] Denizot F, Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89: 271–277.

- [160] Uludag H, Sefton MV: Colorimetric assay for cellular activity in microcapsules. *Biomaterials* 1990; 11: 708–712.
- [161] Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A: In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 1993; 14: 359–363.
- [162] Bergmayer HU (ed): Enzymes 1; Oxidoreductases, Transferases. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Volume III*. 3. Edition, Verlag Chemie Weinheim 1983 (ISBN 3527260439).
- [163] Guicciardi ME, Gores GJ: Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54: 1024–1033.
- [164] Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Vreeken J, Bossuyt PM: The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35 (8): 569–579.
- [165] Waring MJ: Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* 1965; 13 (1): 269–282.
- [166] Wang XM, Terasaki PI, Rankin GW: A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum Immunol* 1993; 37: 264–270.
- [167] Korber DR, Choi A, Wolfaardt GM, Caldwell DE: Bacterial plasmolysis as a physical indicator of viability. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62 (11): 3939–3947.
- [168] Sauer M, Haubner C, Mencke T, Altrichter J, Nöldge-Schomburg G, Stange J: Screening of liver functions with a cell based biosensor in patients with septic shock (abstract). *Inflamm Res* 2007; 56 (2): A 334.
- [169] Ealy DF, Hargreaves T, Lambert HP: Jaundice in severe infection. *Brit Med J* 1965; 2: 75–77.
- [170] Vermillon S, Gregg J, Baggenstossa A: Jaundice associated with bacteraemia. *Arch Intern Med* 1969; 124: 611–616.
- [171] Dahn MS, Wilson RF, Lange MP, Stone A, Jacobs LA: Hepatic parenchymal oxygen tension following injury and sepsis. *Arch Surg* 1990; 125: 441–443.
- [172] Vara E, Aria-Diaz J, Torres-Melero J, Garcia C, Rodriguez JM, Balibrea JL: Effect of different sepsis-related cytokines on lipid synthesis by isolated hepatocytes. *Hepatology* 1994; 20: 924–931.
- [173] Yang S, Koo DJ, Zhou M, Chausry I, Wang P: Gut derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279 (6): 1274–1281.

- [174] Utili R, Abernathy CO, Zimmerman HJ: Studies on the effects of E.coli endotoxin on canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. *J Lab Clin Med* 1977; 89(3): 471–482.
- [175] Ganey PE, Roth RA: Concurrent inflammation as a determinant of susceptibility to toxicity from xenobiotic agents. *Toxicology* 2001; 169 (3): 195–208.
- [176] Ibanez L, Perez E, Vidal X, Laporte JR: Prospective surveillance of acute serious liver disease unrelated to infectious, obstructive, or metabolic diseases: epidemiological and clinical features, and exposure to drugs. *J Hepatol* 2002; 37: 592–600.
- [177] Vanhorebeek J, DeVas R, Wouters PJ, DeWolf-Peeters C, Van den Berghe G: Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet* 2005; 365: 53–59.
- [178] Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M: Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360: 219–223.
- [179] Crouser ED: Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* 2004; 4: 729–741.
- [180] Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA: Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys* 1997; 345: 278–288.
- [181] Fink MP: Cytopathic hypoxia – Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 2001; 17: 219–233.
- [182] Tavakoli H, Mela L: Alterations of mitochondrial metabolism and protein concentrations in subacute septicemia. *Infect Immun* 1982; 38: 536–541.
- [183] Koch T, Funk RH: Zelluläre Dysfunktion in der Pathogenese des Organversagens. Neue Erkenntnisse durch molekular- und zellbiologische Methoden. *Der Anaesthesist* 2001; 50 (10): 742–749.
- [184] Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y: Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. *Hepatology* 1986; 6 (4): 701–707.
- [185] Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27 (7): 1230–1251.

- [186] Ayala A, Evans TA, Chaudry IH: Does hepatocellular injury in sepsis involve apoptosis? *J Surg Res* 1998; 76 (2): 165–173.
- [187] Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B: Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286 (5): 769–776.
- [188] Wang D, Yang E, Cheng LY: Effects of IFN- γ , TNF- α and EGF on the expression of HLA class I antigen and the proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Anticancer Res* 1997; 17: 181–188.
- [189] Mogilenko DA, Dizhe EB, Shavva VS, Lapikov IA, Orlov SV, Perevozchikov AP: Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. *Biochemistry* 2009; 48 (50): 11950–11960.
- [190] Regueira T, Lepper PM, Brandt S, Ochs M, Vuda M, Takala J, Jakob SM, Djafarzadeh S: Hypoxia inducible factor-1 alpha induction by tumour necrosis factor-alpha, but not by toll-like receptor agonists, modulates cellular respiration in cultured human hepatocytes. *Liver Int* 2009; 29 (10): 1582–1592.
- [191] el-Saadany MA, Rawel HM, Raila J, el-Dashloty MS, Schweigert FJ: Antioxidants modulate the IL-6 induced inhibition of negative acute-phase protein secretion in HepG2 cells. *Cell Biochem Funct* 2008; 26 (1): 95–101.
- [192] Kwakkel J, Wiersinga WM, Boelen A: Interleukin-1 β modulates endogenous thyroid hormone receptor alpha gene transcription in liver cells. *J Endocrinol* 2007; 194: 257–265.
- [193] Jakobs TC, Mentrup B, Schmutzler C, Dreher I, Kohrle J: Proinflammatory cytokines inhibit the expression and function of human type I 5'-deiodinase in HepG2 hepatocarcinoma cells. *Eur J Endocrinol* 2002; 146 (4): 559–566.
- [194] Kuhla A, Eipel C, Abshagen K, Ibrahim S, Menger MD, Vollmar B: Bedeutung der TNF- α -abhängigen Fas/FasL-Zytotoxizität für die hepatozelluläre Apoptose im Modell des Gal/LPS-induzierten akuten Leberversagens. *Chirurg Forum* 2008; 37: 13–14.
- [195] Yang L, Shi W, Wang J, Jiang X, Feng W, Li Z: Comparison of cell deaths induced by transmembrane and secretory TNF-alpha. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27 (2): 117–119.

- [196] Nakai K, Tanaka H, Hanada K, Ogata H, Suzuki F, Kumada H, Miyajima A, Ishida S, Sunouchi M, Habano W, Kamikawa Y, Kubota K, Kita J, Ozawa S, Ohno Y: Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Drug Metab Dispos* 2008; 36 (9): 1786–1793.
- [197] Li T, Jahan A, Chiang JY: Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells. *Hepatology* 2006; 43 (6): 1202–1210.
- [198] Kassardjian A, Kreydiyyeh SI: JNK modulates the effect of caspases and NF-kappaB in the TNF-alpha-induced down-regulation of Na⁺/K⁺-ATP-ase in HepG2 cells. *J Cell Physiol* 2008; 216 (3): 615–620.
- [199] Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA: Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278 (16): 13740–13746.
- [200] Rosado JA, Rosenzweig I, Harding S, Sage SO: Tumor necrosis factor-alpha inhibits store-mediated Ca²⁺-entry in the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280 (6): 1636–1644.
- [201] Cobb JP, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS: Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis. *Surg Infect (Larchmt)* 2000; 1 (3): 207–215.
- [202] Paxian M, Bauer I, Rensing H, Jaeschke H, Mautes AE, Kolb SA, Wolf B, Stockhausen A, Jeblick S, Bauer M: Recovery of hepatocellular ATP and “pericentral apoptosis” after hemorrhage and resuscitation. *FASEB J* 2003; 17 (9): 993–1002.
- [203] Leist M, Jaattela M: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 589–598.

9. Thesen

- 1) Die Sepsis zählt zu den Haupttodesursachen der westlichen Welt mit ansteigender Inzidenz. Die Letalität der Sepsis liegt zwischen 29 und 35 %, beim septischen Schock sogar bei ca. 60 %. Das Sozialwesen der BRD wird durch direkte und indirekte Kosten durch Sepsiskranke jährlich mit zwischen 3,6 bis 7,9 Milliarden Euro belastet.
- 2) Es ist seit langem bekannt, dass die schwere Sepsis unabhängig vom Infektionsherd zu Leberfunktionsstörungen führen kann, wobei neuere Untersuchungen zeigen, dass die Leberfunktion bereits sehr früh nach Einsetzen der Sepsis betroffen ist.
- 3) Statische Tests (wie die Bestimmung der Transaminasen, LDH, AP, Bilirubin, Albumin oder der Gerinnungsfaktoren) zeigen ihre Schwäche in der fehlenden zeitnahen Erfassung eines Leberzellschadens. Hierzu besser geeignete dynamische Tests (wie der MEGX-Test oder die ICG-Clearance) lassen jedoch keine Differenzierung zwischen einem Leberzellschaden und einer hepatischen Perfusionsstörung zu.
- 4) Zellsensor-Systeme (Biosensoren) sind in der toxikologisch-pharmazeutischen Analytik, der biotechnologischen Industrie, der Umwelt- und Lebensmittelanalytik und auch im klinisch-medizinischen Bereich seit langem etabliert.
- 5) Im Rahmen dieser Promotion wird ein selbst entwickeltes patentrechtlich geschütztes Biosensorsystem (Zytotoxizitätstest) unter Verwendung der etablierten humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2/C3A vorgestellt, das der frühzeitigen Diagnose eines Leberschadens/Leberversagens dienen soll. Ein vergleichbarer Test existiert weltweit nicht.

- 6) Dieser Zytotoxizitätstest wird in der vorliegenden Promotionsarbeit im Rahmen einer Pilotstudie mit Patienten im septischen Schock (n = 10) sowie einer Kontrollgruppe bestehend aus intensivpflichtigen Patienten ohne Zeichen einer Sepsis (n = 5) und einer zweiten Kontrollgruppe bestehend aus gesunden Probanden (n = 13) vorgestellt. Dabei wurde das Patientenplasma mit den Sensorzellen inkubiert. Anhand der Stoffwechselprodukte sollte eine etwaige Schädigung auf zellulärer Ebene erfasst werden.
- 7) Zielparameter des Zytotoxizitätstest sind der Aktivierungsgrad auf Cytochrom P450-Enzymsystemebene (gemessen mit dem Ethoxyresorufin-Test), die Proteinbiosynthese (durch Bestimmung von Mikroalbumin) sowie die Vitalität und Proliferation (durch den XTT-Test, Messung der LDH-Freisetzung und Live/Dead-Test) der Sensorzellen. Letztendlich wurden dann die Ergebnisse des Biosensorsystems mit den klinischen Daten, insbesondere Leberfunktions- und Entzündungsmarker der eingeschlossenen Patienten korreliert.
- 8) Die 28-Tage-Mortalität der septischen Gruppe betrug 30 %. Alle Patienten bzw. Probanden der nicht-septischen sowie der gesunden Kontrollgruppen überlebten.
- 9) Drei Probanden der septischen Testgruppe wiesen die Zeichen des Leberversagens mit deutlich erhöhten Bilirubinwerten auf, wobei hiervon lediglich ein Proband verstarb. Die beiden weiteren nicht überlebenden Probanden wiesen dagegen normwertige Bilirubinwerte auf.
- 10) Die Cytochrom P450 (CYP) 1A2 Isoenzym-Aktivität und die Syntheseleistung von Mikroalbumin der HepG2/C3A-Zellen, welche mit dem Plasma der septischen Patienten inkubiert wurden, war signifikant geringer als bei den Kontrollgruppen. Besonders niedrige Messergebnisse zeigten hier die nicht überlebenden Probanden der septischen Testgruppe.
- 11) Die CYP 1A2-Aktivität zeigte zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses signifikante Unterschiede zwischen den überlebenden und nicht überlebenden septischen Patienten. Im Beobachtungszeitraum dieser Studie über 54 Stunden zeigten die überlebenden septischen Patienten ansteigende, die nicht überlebenden Probanden fallende Aktivitäten.

- 12) Es zeigten sich weiterhin geringere Werte im XTT-Test bei der septischen Gruppe und abfallende Messergebnisse bei den hier nicht überlebenden Probanden im 54-stündigen Studienverlauf. Die LDH-Messung im Überstand zeigte niedrigere Werte bei der septischen Studiengruppe und zeigte ebenfalls abfallende Werte nach den 54 Stunden des Beobachtungszeitraumes.
- 13) Bei EISS handelt es sich um ein zellbasiertes extrakorporales bioartifizielles Immununterstützungssystem, bei dem unter der Behandlung bei Betrachtung der untersuchten Parameter und der Behandlungseffekte signifikante Unterschiede der septischen Studiengruppe zu beiden Kontrollgruppen festzustellen waren, als Trend zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den überlebenden und nicht überlebenden septischen Probanden.
- 14) In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die in der Literatur beschriebenen Einschränkungen der Leberzellfunktion nach Einwirkung zytotoxischer Substanzen mit dem in dieser Promotion vorgestellten leberzellbasierten Biosensor ebenfalls erfasst werden. Bei Patienten mit septischem Schock führt das Plasma, welches mit HepG2/C3A-Zellen inkubiert wird, zu einer Beeinträchtigung der zellulären Funktion der eingesetzten Sensorzellen.
- 15) Als Hauptmechanismen der Zellfunktionseinschränkung durch Inkubation mit dem Plasma septischer Probanden auf HepG2/C3A-Zellen sind die Wirkungen von proinflammatorischer Zytokinen, von Medikamenten und derer Metabolite anzusehen.
- 16) Der vorgestellte leberzellbasierte Biosensor könnte dazu beitragen, eine frühere Diagnose des Leberversagens bei septischen Patienten zu ermöglichen. Weiterführende, fallzahlstärkere klinische Studien mit septischen Patienten müssen die klinische Relevanz dieses Biosensors bestätigen.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Universität Rostock zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Zytotoxizitätstest zur Ermittlung der Leberfunktion auf der Basis
humaner Hepatozyten (Biosensor) bei septischen Patienten:
Ergebnisse einer Pilotstudie**

selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in dieser Schrift angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit bisher bei keiner anderen als der genannten Fakultät zur Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, im Juli 2010

Cristof Haubner