Aus der Klinik
für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie
Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin
Campus Virchow Klinikum

DISSERTATION

Beurteilung biochemischer Stoffwechselaktivitäten eines hybriden Leberunterstützungssystems während erster klinischer Anwendungen

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

vorgelegt der medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt Universität zu Berlin

von
Adrian Phillip Mundt
aus Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Neuhaus
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Schnoy
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Hopf

Datum der Einreichung: 28.10.2001
Datum der Promotion: 10. Juni 2002

Zusammenfassung

Ziel der Arbeit ist die Beurteilung der biochemischen Stoffwechselaktivität eines hybriden, extrakorporalen Leberunterstützungssystems während initialer therapeutischer Anwendungen. Das System basiert auf der Nutzung porciner Hepatozyten, die in einem Bioreaktor kultiviert werden. Acht Patienten in akutem Leberversagen, Komagrad III-IV, wurden unter kontinuierlicher Plasmaseparation mit dem System behandelt.

Es wird ein Modell zur Bestimmung der Netto-Stoffwechselbilanz des Bioreaktors vorgestellt. Dieses Modell basiert auf der gleichzeitigen Bestimmung von Stoffkonzentrationen im Patientenplasma, gewonnen vom Patienten direkt und nach Durchfließen des Bioreaktors in bestimmten Zeitintervallen. Die Stoffwechselaktivität des Bioreaktors bezüglich der Stoffe Ammonium, Glutamin, Harnstoff, porcines Albumin, Glucose und Laktat wird dargestellt. Fünf der sieben eingesetzten Bioreaktoren nahmen kontinuierlich Ammonium auf, sechs von sieben Bioreaktoren synthetisierten Harnstoff und alle Bioreaktoren synthetisierten porcines Albumin. Die Ergebnisse zeigen, daß die Parameter Harnstoff und Ammonium am besten geeignet sind, Aussagen über die Stoffwechselaktivität der Bioreaktoren während der Therapie zu liefern. Porcines Albumin kann retrospektiv als Kontrolle der Syntheseleistung eingesetzt werden, steht aber nicht während der Therapie zur Verfügung. Die Bilanzierung von Glucose wird am stärksten durch äußere Einflußfaktoren gestört. Laktat stellt sich als ungeeignet für eine Verlaufskontrolle heraus, weil die Bioreaktoren die stark schwankenden Patientenplasmaspiegel nur unwesentlich beeinflussen konnten.

Abstract

A hybrid liver support system based on porcine liver cells was investigated in patients suffering from acute liver failure, coma stage III-IV. The biochemical activity of the system during the application was studied. Patient plasma was drawn systemically and after circulation through the bioreactor system at four hour intervals. A method is introduced that takes into account the rate of plasma flow and the differences in plasma concentration systemically and after circulation through the liver support system to determine the net release or uptake of metabolites such as ammonia, urea and glucose, glutamine, porcine albumine, lactate. Urea release was seen in 6 out of 7 bioreactors at all time points during treatment. Continuous ammonia uptake was seen in 5 out of 7 bioreactors used for treatment. Porcine albumine was seen in all patients. An active role of the system in glucose metabolism was observed. Lactate levels did not yield any information on bioreactor metabolic activity. All patients were bridged successfully to liver transplantation.

Schlagworte:

Hybride Leberunterstützung

extrakorporal

Ammonium

Harnstoff

Keywords:

Hybrid liver

extracorporeal

ammonia

urea

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 8

1.1 Akutes Leberversagen 10

1.2 Die hepatische Enzephalopathie 12

1.2.1 Ammonium 13

1.2.2 Mercaptane 14

1.2.3 Kurz- und mittelkettige Fettsäuren 14

1.2.4 Phenole 14

1.2.5 Synergismus der einzelnen Neurotoxine 14

1.3 Ammonium-, Aminosäure- und Proteinstoffwechsel, Harnstoffzyklus 15

1.4 Glucosestoffwechsel der Hepatozyten 19

1.5 Laktatstoffwechsel 19

1.6 Konservative Therapie des akuten Leberversagens 20

1.7 Leberunterstützungssysteme 20

1.7.1 Künstliche Leberunterstützungssysteme 20

1.7.2 Biologische Leberunterstützungssysteme 21

1.7.3 Hybride Leberunterstützungssysteme 22

1.8 Indikation für die extrakorporale Leberunterstützung 24

1.9 Beurteilung der Stoffwechselaktivität hybrider Leberunterstützungssysteme anderer Arbeitsgruppen 25

1.9.1 Arbeitsgruppe Demetriou[89, 90] 25

1.9.2 Arbeitsgruppe Sussman, Kelly[95] 26

1.9.3 Arbeitsgruppe Margulis[97, 98] 26

1.10 Fragestellung der eigenen Arbeit 27

2 MATERIAL UND METHODEN 29

2.1 Beschreibung des Leberzellreaktors 29

2.2 Sicherheitsfunktionen des Bioreaktors 31

2.3 Systemaufbau 34

2.4 Spendertiere 34

2.5 Organentnahme 35
2.6 Zellisolierungsverfahren 35
2.7 Zellmenge und -viabilität, Quantifizierung der Zellschädigung 37
2.8 Kulturmedium 37
2.9 Zelleinfüllung 38
2.10 Der Zellkulturbetrieb 38
2.10.1 Einstellungen 39
2.10.2 Funktions- und Qualitätsabschätzung der Zellkultur 39
2.10.3 Leberfunktionstests und Stoffwechselleistung 40
2.10.4 Protokollierung 40
2.11 Voraussetzungen für den klinischen Einsatz und Therapieplanung 40
2.12 Einschlußkriterien 41
2.13 Ausschlußkriterien 41
2.14 Darstellung der Plasmaseparation 42
2.15 Therapieüberwachung und Datenerhebung 42
2.16 Bestimmung der Stoffwechselleistung 42
2.17 Bestimmung der Parameter 43
2.17.1 Bestimmung der Glucose–Konzentration 43
2.17.2 Bestimmung der Laktat-Konzentration 44
2.17.3 Bestimmung der Harnstoff-Konzentration 44
2.17.4 Bestimmung der Ammonium-Konzentration 44
3 ERGEBNISSE 46
3.1 Ammoniumstoffwechsel 48
3.2 Glutaminstoffwechsel 51
3.3 Harnstoffwechsel 53
3.4 Liberation porcinen Albumins 57
3.5 Glucosestoffwechsel 59
3.5.1 Glucosespiegel der Patienten 59
3.5.2 Begleitmedikation mit Einfluß auf den Glucosespiegel des Patienten 60

3.5.3 Glucosestoffwechsel des Bioreaktors 63
3.6 Laktat 64
4 DISKUSSION 71
4.1 Ammoniumstoffwechsel 72
4.2 Glutaminstoffwechsel 74
4.3 Harnstoffwechsel 74
4.4 Porcines Albumin 76
4.5 Glucosestoffwechsel 77
4.5.1 Glucoseeinstellung der Patienten während der Therapie 77
4.5.2 Glucosestoffwechsel des Bioreaktors 77
4.6 Laktatstoffwechsel 78
4.7 Effektivität hybrider Leberunterstützungssysteme im klinischen Einsatz / Möglichkeiten der Optimierung 79
4.8 Risiken hybrider Leberunterstützungssysteme 83
4.8.1 Antikoagulation 83
4.8.2 Biokompatibilität 84
4.8.3 Transmissionsrisiko durch xenogenen Kontakt 84
4.8.4 Immunologische Aspekte 85
4.9 Ethische Aspekte 86
4.10 Ausblick 87
4.10.1 Zellquellen 87
4.10.2 Qualitätssicherung hybrider Leberunterstützungssysteme 89
Literaturverzeichnis 90
Abkürzungsverzeichnis 100
Lebenslauf 102
Danksagung 103
Erklärung an Eides Statt 104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Glutaminzyklus und des Harnstoffzyklus.....17

Abb. 2: Schematische Darstellung des hLUS.....29

Abb. 3: Schematische Darstellung des Kapillarnetzwerkes 30

Abb. 4: Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs. 33

Abb. 5: Ammoniumspiegel der Patienten während der Therapie 48

Abb. 6: Ammoniumplasmaspiegel in Patient 6 und Bioreaktor 6.....49

Abb. 7: Ammoniumaufnahme und -freisetzung durch die Bioreaktoren 50

Abb. 8: Verlauf der Glutaminspiegel der Patienten während der Therapie 51

Abb. 9: Glutaminaufnahme/-freisetzung der Bioreaktoren 52

Abb. 10: Verlauf der Harnstoffspiegel aller Patienten während der Therapie 53

Abb.10 a: Verlauf der Harnstoffspiegel aller Patienten außer Patient 2 54

Abb. 11: Creatininspiegel aller Patienten während der Therapie.....55

Abb. 12: Harnstoffplasmaspiegel in Patient 6 und Bioreaktor 6.....57

Abb. 14: Schweinealbumin-Plasmakonzentration der Patienten.....58

Abb. 15: Glucosespiegel der Patienten während der Therapie.....59

Abb. 16: Fresh Frozen Plasma.....62

Abb. 17: Glucosefreisetzung/-aufnahme durch die Bioreaktoren während der Therapie 63

Abb. 18: Glucoseplasmaspiegel von Patient 6 und Bioreaktor 6 64

Abb. 18: Laktatplasmaspiegel von Patient 1 und Bioreaktor 1 65

Abb. 19: Laktatplasmaspiegel Patient 2 und Bioreaktor 2 66

Abb. 20: Laktatplasmaspiegel von Patient 3 und Bioreaktor 3 66

Abb. 21: Laktatplasmaspiegel von Patient 4 und Bioreaktor 4 67

Abb. 22: Laktatspiegel Bioreaktor um 2 Std. verzögert und Patient 4.....68

Abb. 23: Laktatplasmaspiegel Patient 5 und Bioreaktor 5 69

Abb. 24: Laktatplasmaspiegel Patient 6 und Bioreaktor 6 69

Abb. 25: Laktatplasmaspiegel von Patient 7 und Bioreaktor 7 70

Abb. 26: Laktatplasmaspiegel Patient 8 und Bioreaktor 8 70

Abb. 27: Ammoniumbilanz von 14 Bioreaktoren aus dem Zellkulturbetrieb.....73

Abb. 28: Netto-Harnstoffbilanz von 7 Bioreaktoren im Zellkulturbetrieb.....75

Abb. 29: Glucosebilanz von 14 Bioreaktoren im Zellkulturbetrieb 78

Abb. 30: Laktatbilanz von 15 Bioreaktoren aus dem Zellkulturbetrieb 79

1 EINLEITUNG

Zur Therapie des Leberversagens befinden sich verschiedene extrakorporale Behandlungsverfahren in der klinischen Erprobung. Neben artifiziellen Verfahren finden sich biologische und hybride, kombiniert biologisch-artifizielle, Verfahren zur Leberunterstützungstherapie. In die Gruppe der letztgenannten gehören Systeme, bei denen Leberzellen in einem extrakorporalen Kreislauf mit dem Plasma der Patienten in Kontakt gebracht werden. Ziel ist eine unterstützende Stoffwechselleistung durch diese Leberzellen, um die Progression des Leberversagens zu stoppen bzw. die Symptome zu mildern, in der Hoffnung, Zeit für eine spontane Regeneration der patienteneigenen Leber zu gewinnen oder eine sichere Überbrückung der Patienten bis zur Durchführung einer Organtransplantation zu ermöglichen.

Neben der klinischen Bewertung solcher Systeme gehört ein Verständnis der Kapazität des Stoffumsatzes zu den Voraussetzungen für eine kritische Evaluation und eine Weiterentwicklung dieser jungen biomedizinischen Methode. Eine solche Beurteilung soll anhand von klinischen Daten für das BELS (Berliner Extrakorporales Leberunterstützungssystem) durchgeführt werden, und die Ergebnisse sollen den Darstellungen anderer Arbeitsgruppen gegenübergestellt werden.

1.1 Akutes Leberversagen

Das akute Leberversagen ist ein schweres, rasch progredientes und oft tödlich verlaufendes Krankheitsbild, dem massive Leberzellschädigung oder -nekrosen zugrunde liegen. Innerhalb von 8-12 Wochen nach Auftreten eines Ikterus kommt es zum Einsetzen der hepatischen Enzephalopathie bei zuvor lebergesunden Personen.[1] In der Folge kommt es zu Störungen im Säure-Basen-Haushalt, der Nierenfunktion, sämtlicher Organsysteme bis hin zu hyperdynamem Kreislaufversagen, Sepsis und der oft lebensbedrohenden Hirndrucksteigerung mit Gefahr einer Herniation.[2] Die Letalität des akuten Leberversagens beträgt in Abhängigkeit der Ätiologie 20%-80%.

Die häufigste Ursache des akuten Leberversagens weltweit sind virale Hepatitiden,[3] gefolgt von medikamenteninduziertem Leberversagen. Jedoch sind große regionale Unterschiede festzustellen. So ist zum Beispiel die Acetaminophenvergiftung mit suizidaler Absicht in Großbritannien die häufigste Ursache, wohingegen sie in anderen Ländern eine untergeordnete Rolle spielt.[4]

Tabelle 1: Ursachen des akuten Leberversagens nach W. M. Lee 1993[5]

Ursache des ALF	**verantwortliches Agens**
Virushepatitis	Hepatitis Virus A, B, C, D, E und F (?) Herpes Simplex Virus
medikamenteninduziert	Acetaminophen idiosynkratische Reaktionen
Toxine	Tetrachlorkohlenstoffe Amanita phalloides Phosphor
gefäßbedingt	Ischämie venöse Verschlußkrankheit Hitzschlag Tumor
verschiedene	Morbus Wilson Schwangerschaftsfettleber Reye's Syndrom

O'Grady schlug eine weitere Einteilung des Leberversagens in hyperakut, akut und subakut vor, mit einem zeitlichen Abstand zwischen Einsetzen des Ikterus und der hepatischen Enzephalopathie von wenigen Tagen beziehungsweise Wochen oder Monaten. Daraus ergibt sich für jede Klasse ein unterschiedlicher Schweregrad der Prognose in Abhängigkeit der Ätiologie.

Tabelle 2: Zuordnung von Klassifikation und Ätiologie des Leberversagens nach O'Grady und Williams[6]

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

Nach Ausschöpfen konventioneller Therapiemethoden stellt die Lebertransplantation die derzeit anerkannte Therapie für das akute Leberversagen dar.[7] Die Überlebensraten in den USA nach Lebertransplantation reichen von 46% bis 89%.[8] Um die Überlebensrate der Patienten zu verbessern, wurden drei prinzipiell unterschiedliche Verfahren entwickelt. Artifizielle Systeme wie Dialyse, Aktivkohlefilter oder Plasmaaustausch können lediglich detoxifizierende Funktionen der Leber übernehmen. Die extrakorporale Perfusion ganzer Organe, die auch metabolische Funktionen übernehmen, konnte sich klinisch bisher nicht durchsetzen. Mit der klinischen Erprobung hybrider Leberunterstützungsverfahren konnten die Effekte der beiden anderen Methoden kombiniert werden. Erste klinische Anwendungen weltweit lieferten vielversprechende Ergebnisse.

1.2 Die hepatische Enzephalopathie

Das akute Leberversagen ist durch das Auftreten einer rasch progredienten Enzephalopathie charakterisiert, die in folgende Stadien eingeteilt werden kann.

Tabelle 3: Gradeinteilung der Enzephalopathie nach Trey[1]

Grad	Bewußtsein	Tremor	EEG	Prognose
I	Wechselnde Verwirrung, Konzentrationsschwäche, wechselnde Stimmung, verwaschene Sprache	leicht	unauffällig	gut
II	Steigerung von Grad I, Verhaltensstörung, Desorientierung, Verlust der Sphinkterkontrolle	positiv	verlangsamt	gut
III	stupurös, erweckbar, inkohärente Sprache	positiv	abnormal	ernst
IVa	komatös, Abwehrreaktion auf Schmerzreiz	negativ	abnormal	ernst
IVb	komatös, fehlende Abwehrreaktion auf Schmerzreiz	negativ	abnormal	ernst

Hirnödem ist eine häufig letale Komplikation des akuten Leberversagens.[9] Die Ursache der hepatischen Enzephalopathie konnte bisher nicht völlig geklärt werden. Eine Auswahl der an der Pathophysiologie beteiligten Stoffe wird im folgenden einzeln besprochen.[10, 11, 12]

1.2.1 Ammonium

Ammonium liegt bei physiologischem pH-Wert zu 1% als diffusionsfähiges Ammoniak NH_3 und zu 99% in seiner ionisierten Form als Ammonium-Ion NH_4^+ vor.[13] In der Literatur und im allgemeinen Sprachgebrauch werden die Begriffe Ammonium und Ammoniak häufig unscharf voneinander abgegrenzt oder Synonym verwendet.

Es gibt Hinweise darauf, daß ein erhöhter Ammoniumplasmaspiegel eine hepatische Enzephalopathie auslösen oder verstärken kann. Zu den neuropsychiatrischen Symptomen eines erhöhten Ammoniumspiegels zählen Stimmungserhöhung, Persönlichkeitsveränderungen, kognitive Defizite, Ataxie, Koma und Krämpfe. Ein verminderter Ammoniumspiegel wirkt sich therapeutisch generell günstig aus.[14] Für den Mechanismus der toxischen Wirkung von Ammonium auf das zentrale Nervensystem gibt es verschiedene Theorien.[15, 16, 17]

1. Eine Veränderung der Blut-Liquor-Schranke führt zu erhöhter Permeabilität für aromatische Aminosäuren, die Vorläufer für bestimmte monoamine Neurotransmitter darstellen.
2. Elektrophysiologische Veränderungen sind Folge einer Hemmung des IPSP (inhibitory postsynaptic potential).

3. Hemmung der Alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase und des Malat-Aspartat Shuttle führen zu einem energetischen Defizit.
4. Die normale Aufnahme, Speicherung und Freisetzung verschiedener Neurotransmitter, so zum Beispiel die Speicherung von Monoaminen, ist gestört.
5. Die hohe Affinität von Astrozyten und Neuronen für die Aufnahme von Glutamat ist gehemmt. Die verminderte Ausprägung des Glutamat-Transporters GLT-1 führt zu erhöhter extrazellulärer Glutamatkonzentration.[18]
6. Die Entgiftung von Ammonium erfolgt über eine erhöhte Bildung von Glutamin in den Astrozyten, die durch osmotische Wirkung für die Hirndrucksteigerung verantwortlich sein könnte.[19] Einige Autoren gehen so weit, zu sagen, daß sämtliche toxischen Wirkungen von Ammonium auf das Gehirn durch die Bildung von Glutamin zustandekommen.[20] Die charakteristische Schwellung der Astrozyten wird als Alzheimer Typ II Astrozytose bezeichnet.[21]
7. Ammonium hat einen direkten Effekt auf GABA-A-Rezeptoren.

1.2.2 Mercaptane

Mercaptane entstehen beim bakteriellen Abbau der Aminosäure Methionin. Die neurotoxischen Mercaptane Methanthiol, Dimethylsulfid und Äthylmercaptan sind bei Patienten mit hepatischer Enzephalopathie in ihrer Konzentration in Blut, Liquor und Urin erhöht. Ihre Neurotoxizität wird mit einer Hemmung der Na+/K+ ATPase erklärt.[13]

1.2.3 Kurz- und mittelkettige Fettsäuren

Kurz- und mittelkettige Fettsäuren entstehen durch Mikroorganismen aus Nahrungsfetten im Darm. Als Mechanismus für die Neurotoxizität werden ebenfalls die Hemmung der Na+/K+ ATPase sowie die Hemmung der hepatischen Harnstoffsynthese und ein vermehrter Tryptophanübertritt in das Gehirn angenommen.[13]

1.2.4 Phenole

Phenole entstehen ebenfalls unter Einwirkung von Mikroorganismen im Darm aus aromatischen Aminosäuren. Der Mechanismus ihrer Neurotoxizität ist ungeklärt.[13]

1.2.5 Synergismus der einzelnen Neurotoxine

Im Tierexperiment wirken die oben genannten Neurotoxine synergistisch. Zum Beispiel ist die zur Auslösung eines Komas benötigte Ammoniumgabe bei gleichzeitiger subkomatöser Gabe von Methanthiol vermindert.[22]

1.3 Ammonium-, Aminosäure- und Proteinstoffwechsel, Harnstoffzyklus

Im folgenden werden kurz die grundlegenden biochemischen Stoffwechselwege der gemessenen Parameter beschrieben. Genaue Kenntnisse sind für eine Beurteilung der Stoffwechselaktivität der Bioreaktoren erforderlich.

Beim erwachsenen Menschen mit einem Körpergewicht von 70kg entfallen etwa 12kg auf Protein. Der Proteinumsatz beträgt 250-300 g/d, die Aufnahme 100 g/d. Die Leber synthetisiert aus Aminosäuren täglich etwa 50g Protein, davon entfallen 14g auf Albumin.[13] Albumin ist ein Sammelbegriff für gut wasserlösliche, globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 66.000 Da. Es dient der Regulierung des intravasalen, onkotischen Drucks und wird ausschließlich durch die Leber synthetisiert, so daß es als leberspezifischer Parameter für die Bewertung der Stoffwechselleistung von Hepatozytenkulturen herangezogen wird. Auch andere Plasmaproteine wie Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren und Apoproteine werden ausschließlich in der Leber synthetisiert. Auch im Aminosäurenstoffwechsel hat die Leber in Wechselwirkung mit anderen Organen eine zentrale Rolle. Das der Leber über das Pfortaderblut zugeführte Aminosäurenspektrum erfährt in der Leber Veränderungen, da die Aminosäuren unter Harnstoffbildung abgebaut und für die Proteinbiosythese oder Glucosebildung verwendet werden oder auch unverändert die Leber passieren.

Da in der Leber überwiegend die aromatischen AS (Phenylalanin, Tyrosin), in der Muskulatur überwiegend die verzweigtkettigen AS (Valin, Leucin, Isoleucin) abgebaut werden, enthält das Blut der Vena hepatica relativ höhere Spiegel an verzweigtkettigen AS als das Pfortaderblut. Die verzweigtkettigen AS dienen in der Muskulatur und im Gehirn der Energiegewinnung. Dagegen können die aromatischen AS, die mit den verzweigtkettigen AS um das Transportsystem der Blut-Hirn-Schranke konkurrieren, im Gehirn in Neurotransmitter umgewandelt werden. Die Ammoniumentgiftung in Gehirn und Muskulatur erfolgt durch Bildung von Glutamin aus Glutamat. Glutamin wird mit dem Blut zur Niere und zur Leber transportiert. In der Leber erfolgt die Entgiftung von Ammonium aus Glutamin über den Harnstoff. Die Leber ist das einzige Organ, das in quantitativ wichtiger Menge Harnstoff erzeugen kann.

Hauptbildungsort des freien Ammoniums[1] sind Darm (300-500 mmol/d), Muskulatur (in Ruhe

---

[1] Unter Ammonium versteht man die Summe von ionisiertem NH_4^+ und nicht ionisiertem NH_3 (Ammoniak). Es besteht ein Dissoziationsgleichgewicht: $NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$. Bei einem Blut-pH im Normbereich von 7,4 liegt Ammonium zu 99% als NH_4^+ vor.

sind Abgabe und Aufnahme ausgeglichen) und Niere (30 mmol/d). Ammonium entsteht aus dem Abbau von Proteinen, Aminosäuren und Harnstoff. Für Darmmukosazellen stellt Glutamin die wichtigste Energiequelle dar. Etwa 20% des in der Leber synthetisierten Harnstoffs werden im Dickdarm von Mikroorganismen hydrolysiert. Der daraus entstehende Ammonium wird erneut der Leber zugeführt. Etwa die Hälfte des zur Harnstoffsynthese benötigten Stickstoffs stammt aus dem Abbau von Aminosäuren in der Leber selbst.

Im einzelnen wird die Eliminierung von Ammonium in der Leber durch den Krebs-Henseleit-Zyklus beschrieben. Durch die Verwertung der Aminosäuren und Proteine entstehen durch die Wirkung von Transaminasen, wie schon beschrieben, große Mengen an GLU aus α-Ketoglutarat, welches Ammonium für den Zyklus anliefert.[23] Ist der Energiebedarf hoch, kann GLU in den Mitochondrien auch wieder zu α-Ketoglutarat desaminiert werden, wobei wiederum vermehrt Ammonium anfällt, aber α-Ketoglutarat für den Citratzyklus bereitgestellt wird. Ammonium kann auch durch die direkte Desaminierung anderer Aminosäuren (Cystein, Serin, Histidin) entstehen. Die meisten AS werden aber zunächst durch Transaminierung in α-Ketosäuren überführt. Die α-Aminogruppen werden zum α-Ketoglutarat geschleust, wodurch Glutamat entsteht, das dann oxidativ durch GLDH zu Ammonium und α-Ketoglutarat desaminiert wird. Die Ammonium-Elimination in der Leber ist über zwei Enzymsysteme möglich:

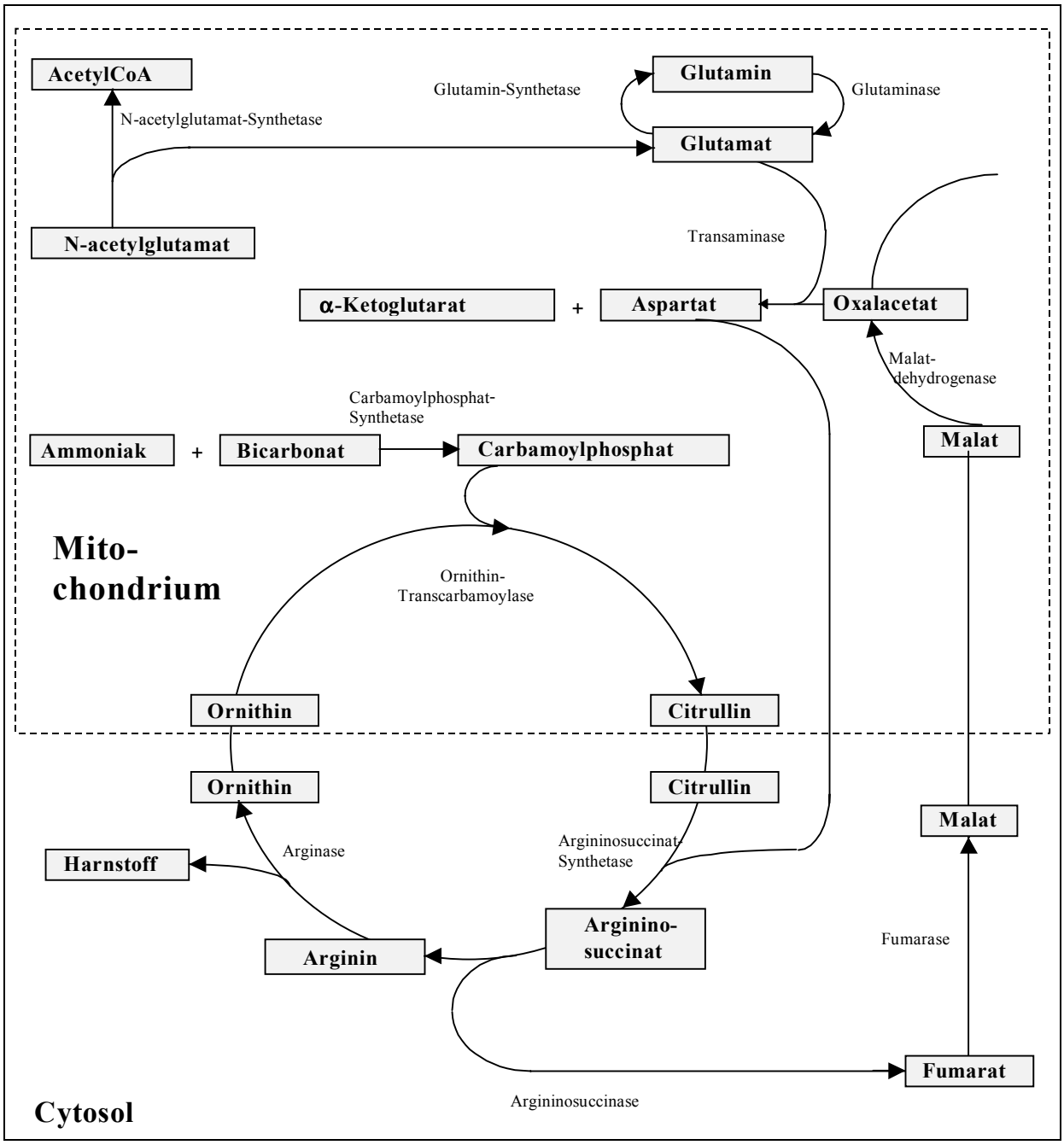

Abb. 1: Schematische Darstellung des Glutaminzyklus und des Harnstoffzyklus

Das erste Enzymsystem zeigt den Glutaminzyklus. Glutamin wird durch Ammoniumübertragung aus Glutamat mittels Glutamin-Synthetase gebildet. Die Abspaltung von Ammoniumionen aus Glutamin erfolgt durch die Glutaminase.

Das zweite Enzymsystem zeigt den Harnstoffzyklus. Im ersten Schritt geschieht die Bildung von Carbamoylphosphat aus Ammonium und Bicarbonat durch die Carbamoylphosphat-Synthetase. Carbamoylphosphat wird auf Ornithin mittels Ornithin-Transcarbamoylase übertragen, wodurch Citrullin entsteht. Citrullin kondensiert dann in einer folgenden Reaktion mit Aspartat durch die

Argininosuccinat-Synthetase zu Argininosuccinat. Schließlich spaltet die Argininosuccinase das Argininosuccinat in Fumarat und Arginin. Arginin ist unmittelbare Vorstufe des Harnstoffs; es wird durch die Arginase zu Harnstoff und Ornithin hydrolysiert. Der Harnstoff wird zu den Nieren transportiert, und das Ornithin ist wieder frei für die Aufnahme von Carbamoylphosphat.

Nach dem Konzept der metabolischen Zonierung sind der Harnstoffzyklus und die Glutaminasereaktion des Glutaminzyklus in der periportalen Zone lokalisiert, während die Glutamin-Synthetasereaktion des Glutaminzyklus in der perivenösen Zone angeordnet ist.[24]

Da das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des periportal lokalisierten Harnstoffzyklus, die Carbamoylphosphat-Synthetase, eine geringere Affinität zu Ammoniumionen hat (K_m= 1–2mmol/l) als die perivenös lokalisierte Glutamin–Synthetase des Glutaminzyklus (K_m= 0,3mmol/l), wird nur bei hohen Konzentrationen Ammonium im Harnstoffzyklus entgiftet. Die Ammoniumionen, die beim Blutstrom des Periportalblutes von periportal nach perivenös nicht über den Harnstoffzyklus entgiftet werden, werden infolge der höheren Affinität der Glutamin-Synthetase zu Ammonium noch in der perivenösen Zone des Leberazinus entgiftet. Auf diese Weise wird das Ammonium sowohl über die Bildung von Harnstoff als auch über die Glutaminsynthese entgiftet. Die Ausprägung der Enzyme des Harnstoffzyklus werden durch das Proteinangebot gesteuert. Sie steigt bei proteinreicher Ernährung, bei Hunger wegen der katabolen Stoffwechsellage und bei Glucocorticoidgabe. Aktivierenden Einfluß auf die Harnstoffsynthese aus Glutamin nimmt das Hormon Glucagon.[25]

Eine weitere wichtige Funktion des Harnstoffzyklus ist die Ausscheidung von Bikorbonat, das zusammen mit dem Ammonium beim Aminosäurekatabolismus anfällt. Damit kommt der Leber ebenfalls eine Bedeutung in der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes zu. Bei dem Absinken des physiologischen pH-Wertes von 7,4 auf unter 7,3 spricht man von Acidose. In acidotischer Stoffwechsellage wird die Ammoniumentgiftung von Harnstoffsynthese zu Glutaminsynthese verlagert, so daß Bicarbonat als Base dem System weiterhin zur Verfügung steht. Die Harnstoffproduktion sinkt gleichzeitig.[26] Neuere Experimente an Ratten deuten darauf hin, daß die Rolle der Leber bei lange anhaltender Acidose untergeordnet ist, weil sich die Harnstoffproduktion nach vier Tagen wieder einem Normalwert angleicht.[27]

Nach der Desaminierung von Aminosäuren können die verbleibenden Kohlenstoffgerüste zur Energiegewinnung in den Citratcyclus oder in die Gluconeogenese eingehen.

Die Quellen zu den biochemischen Grundlagen sind dem Buch *The liver: biology and pathobiology*[13] zu entnehmen.

1.4 Glucosestoffwechsel der Hepatozyten

Die Leber hat zentrale Funktion bei der Aufrechterhaltung eines konstanten Glucosespiegels. Bei Nahrungsaufnahme gelangt die Glucose über das Pfortaderblut zur Leber. Die Glucose kann dort gespeichert und bei Nahrungskarenz zur Energieversorgung an die peripheren Gewebe abgegeben werden, indem 4,5 g/h aus Glycogenolyse und 3 g/h durch Gluconeogenese aus Aminosäuren, Lactat, Glycerin sowie aus Transformation anderer Kohlenhydrate bereitgestellt werden. Dabei sind die Zellen einiger Gewebe, Erythrozyten, Retina und Nierenmark obligat auf Glucose als Energiesubstrat angewiesen.[28] Die Hormone Insulin und seine Gegenspieler Glucagon und Noradrenalin sowie Glucocorticoide regulieren die Enzyme, die an der Glycolyse, Glycogensynthese sowie Gluconeogenese beteiligt sind.[29] Bei Glucoseaufnahme durch die Nahrung werden ca. 37% der Glucose vornehmlich im Gehirn oxidiert. 63% der Glucose werden hauptsächlich in der Leber in Form von Glycogen gespeichert. Dabei geschieht die Glucoseaufnahme in die Leber hauptsächlich über den Glut-2-Glucosetransporter,[30] der im Gegensatz zum Glut-4-Glucosetransporter, der in Muskulatur und Fettgewebe ausgeprägt ist, nicht auf intrazelluläre Membranen translociert werden kann. Der transmembranäre Glucosetransport ist daher unabhängig von hormoneller Regulation und nicht limitierend für Glucoseaufnahme oder -freisetzung. Als weitere Faktoren für Glucoseaufnahme in die Leber gelten Glucose per se[31] und die Innervation.[32] In einer Hepatozytenkultur von Ratten fanden Ohno et al. 1994,[33] daß die Sauerstoffversorgung entscheidender Faktor für die Regulation der Glycolyse war. Durch ein Absenken der Sauerstoffversorgung wurden Glycolyse und Laktatbildung angeregt. Den Hormonen Insulin und Glucagon kam hier eine untergeordnete Rolle zu.

1.5 Laktatstoffwechsel

Die Laktatbildung im Körper erfolgt unter anaeroben Bedingungen bei kataboler Stoffwechsellage, wenn die Pyruvatproduktion durch die Glycolyse die Rate der Pyruvatoxidation durch den Citratzyklus übersteigt.

Die Laktatbildung wird im Organismus für die anaerobe Regenerierung von NAD^+ verwendet. Damit dient die Glycolyse in den Skelettmuskeln und den Erythrozyten der Bereitstellung von Energie. Die Laktatbildung verlagert einen Teil der Stoffwechsellast von der Muskulatur auf die Leber. Die Leber verwertet das Laktat dann zur Gluconeogenese.[13]

In der Hypoxie wird die Leber zur Deckung ihres eigenen Energiebedarfes von einem Laktatverwerter zu einem Laktatproduzenten. Die Hypoxie bewirkt eine unzureichende Regenerierung von NADH, wodurch ein intrazellulärer Anstieg der H^+-Ionen-Konzentration

entsteht. Die H^+-Ionen werden von intra- nach extrazellulär verlagert und verursachen dort eine metabolische Laktatazidose, wenn die Pufferkapazität des Blutes nicht ausreicht. Bei akutem Leberversagen kommt es zu einem Anstieg der Laktatkonzentration im Plasma, der zu einer metabolischen Azidose führt.[34, 35]

1.6 Konservative Therapie des akuten Leberversagens

Zur metabolischen Behandlung der hepatischen Enzephalopathie werden folgende intensivmedizinische Maßnahmen durchgeführt:

1. Durch selektive Darmdekontamination (z.B. mit Nystatin) werden Darmbakterien abgetötet, die für einen Großteil der Ammoniumbildung verantwortlich sind.
2. Adaptierte Aminosäureinfusionen sind frei von aromatischen Aminosäuren und hoch im Gehalt an verzweigtkettigen Aminosäuren.

Zur Prophylaxe der Hirndrucksteigerung gibt es folgende Möglichkeiten:

Mannitol-Infusionen, Hochlagerung des Oberkörpers um 30°, milde Hyperventilation, Hypothermie.

Der Hypoglykämie wird durch Glucoseinfusion entgegengewirkt.

Die Patienten unterliegen gleichzeitig der Gefahr einer Blutung durch den Mangel an Gerinnungsfaktoren und einer disseminierten intravasalen Gerinnung DIC durch den Mangel an gerinnungshemmenden Faktoren. Maßnahme ist die Gabe von: FFP, PPSB, EK, TK, Heparin, AT III, Aprotinin.

Zur Prophylaxe des Nierenversagens werden folgende Substanzen gegeben: Furosemid i.v., Urodilatin i.v., Dopamin i.v.

Bei Hypalbuminämie wird Humanalbumin i.v. gegeben.

Bei der Intoxikation mit Paracetamol steht Acetylcystein i.v. als Antidot zur Verfügung, bei der Intoxikation mit Knollenblätterpilz steht Sibilin i.v. als Antidot zur Verfügung.

1.7 Leberunterstützungssysteme

1.7.1 Künstliche Leberunterstützungssysteme

Austauschperfusion

In den siebziger Jahren führte man die Austauschperfusion, Vollblutersatz bei gleichzeitigem Aderlaß, durch, um Entgiftungsfunktionen der Leber zu ersetzen[36, 37]. Das Verfahren konnte die Mortalität nicht senken, zudem bestand das Risiko eines Transfusionssyndroms mit Nieren- und Lungenversagen.

Plasmapherese

Seit Beginn der achtziger Jahre gab es Bestrebungen, die Patienten durch Plasmapherese zu entgiften, indem man das Patientenplasma durch FFP-Konserven ersetzte.[38, 39, 40, 41] Kontrollierte Studien zur Effektivität und Mortalität gibt es nicht. Das Risiko eines Transfusionssyndromes besteht gleichermaßen wie bei der Austauschperfusion. Regenerative Faktoren, wie z. B. HGF, werden dem Plasma entzogen.

Dialyse, Hämofiltration, Aktivkohlefiltration

Zahlreiche künstliche Leberunterstützungsysteme, die auf Dialyse und Hämofiltration durch Flach-Membranen oder Hohlfasermodule basieren, sowie Aktivkohlefiltration wurden klinisch erprobt. Bei der Dialyse werden niedermolekulare Plasmabestandteile entfernt.[42, 43] Die Hämofiltration entfernt zusätzlich Substanzen mittleren Molekulargewichts aus dem Plasma. Eine kontrollierte Studie an zehn Patienten zeigte ein schlechteres Ergebnis für die Behandlung mit Aktivkohlefiltration und Austauschharzen nach Plasmaseperation als für eine konventionell behandelte Kontrollgruppe.[44] Eine weitere Studie zur Aktivkohlefiltration, durchgeführt an 137 Patienten am Londoner King's College, zeigte eine Abhängigkeit der Überlebensrate nur von der Ätiologie des Leberversagens.[45] Nachteil der künstlichen Verfahren ist es, daß die Substanzen ungerichtet aus dem Plasma entfernt werden. Dabei kommt es neben einer Entgiftung immer auch zum Verlust wichtiger körpereigener Stoffe, wie z.B. der für die Leberregeneration benötigten Wachstumsfaktoren. Man kam mehr und mehr zu der Überzeugung, daß die komplexen regulatorischen Funktionen, die Vielzahl der Stoffwechselleistungen in Auf- und Abbau von Substanzen, nicht durch rein künstliche Verfahren zu ersetzen seien und begann mit der Entwicklung von hybriden Systemen, die biologische und künstliche Komponenten kombinieren. Dennoch laufen zur Zeit große klinische Studien zu rein artifiziellen Systemen, die große logistische Vorteile gegenüber den hybriden Systemen haben und effektive Entgiftungsleistung aufweisen.

1.7.2 Biologische Leberunterstützungssysteme

Extrakorporale Fremdorganperfusion

Die extrakorporale Perfusion menschlicher Organe wurde klinisch erprobt.[46, 47] Es gibt positive Einzelfallschilderungen. Perfusionszeiten von bis zu 39 Stunden wurden realisiert.[48] Aufgrund hervorragender Ergebnisse der Lebertransplantation ist die extrakorporale Perfusion menschlicher Lebern heute nicht mehr gerechtfertigt.

Extrakorporale Perfusionen tierischer Organe von Primaten[49] und von Schweinen[50, 51, 52]

wurden durchgeführt. Bei Perfusion mit Vollblut jedoch sind Perfusionsstörungen wegen hyperakuter Abstoßungsreaktionen nach wenigen Minuten bis Stunden therapiebegrenzend.[53, 54] Bei mehrfacher Anwendung kann es zu Hypersensitivitätsreaktionen vom anaphylaktischen Typ kommen.[55] Neuere Verfahren befinden sich in der Erprobung, um die Perfusionszeiten zu verlängern. Medikamentöse Behandlung mit Prostaglandin E1 und Insulin zeigte Erfolg mit einer deutlichen Verlängerung der Perfusionszeit.[56] Immunoadsorptionsverfahren wurden entwickelt, um die menschlichen Anti-Schwein-Antikörper vor der Perfusion des Fremdorgans aus dem Blut zu entfernen.[57, 58]

Xenotransplantation

Die Transplantation tierischer Organe war bisher auf Grund der hyperakuten Abstoßungsreaktion nicht erfolgreich.[59, 60, 61] Ein Risiko der Xenotransplantation bilden bekannte sowie unbekannt humanpathogene Erreger. Neben dem ungelösten Problem der immunologischen Abstoßung bleibt die Ungewißheit über die dauerhafte Funktion des Transplantates aufgrund physiologischer Differenzen zwischen den Spezies.

1.7.3 Hybride Leberunterstützungssysteme

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden künstliche und biologische Komponenten in hybriden Systemen kombiniert, um neben der Entgiftungsfunktion rein artifizieller Verfahren auch regulierende Funktionen zu ermöglichen. Dazu wurden entweder primäre Leberzellen von Mensch oder Tier (Schwein, Kaninchen) oder in-vitro kultivierte Hepatoblastomzellinien verwendet. Gentechnologisch immortalisierte Zellen[62, 63] und humane Leberstammzellen[64, 65, 66] sind in der Erprobung. Bei den gentechnologisch immortalisierten Zellen ist der Verlust spezifischer Funktionen wie Albumin- und Harnstoffsynthese ein ungelöstes Problem,[67] obwohl es Bestrebungen gibt, die Zellen gezielt mit Genen für einzelne biologische Funktionen zu transfizieren.[68]

In extrakorporalen LUS werden die Hepatozyten in einem künstlichen Gehäuse kultiviert und über den extrakorporalen Kreislauf mit Vollblut oder, bei erfolgter Plasmaseparation, mit Plasma perfundiert.

Wesentliche Bedingung für die Konstruktion hybrider Systeme war die Entwicklung semipermeabler Hohlfasermembranen,[69, 70, 71] mit denen es möglich wurde, zelluläre und immunkompetente Bestandteile des Plasmas von der Zellkultur zu trennen. Somit wurden Abstoßungsreaktionen vermieden und gleichzeitig Stoffaustausch ermöglicht. Mit künstlichen Membranen wurden stabile Perfusionsverhältnisse geschaffen, während bei der Perfusion ganzer Organe die Destruktion der Mikrozirkulation therapielimitierend war. Eine weitere

Voraussetzung für die Entwicklung hybrider Leberunterstützung war die Entdeckung geeigneter Zellisolierungs- und Kultivierungstechniken. Erst mit der Einführung enzymatischer Isolierungsverfahren durch Berry 1969,[72] modifiziert durch Seglen 1972 und 1973[73, 74, 75] konnten quantitativ und qualitativ relevante Zellmassen in Einzelzellsuspension gewonnen werden. Die Methode wurde von Gerlach et al. zu einem 5-Schritt-Verfahren weiterentwickelt.[76, 77, 78] Gezielte Verbesserung der Hepatozytenfunktion und Verlängerung der Überlebenszeit in Kultur wurden durch folgende Verfahren erreicht:

- Immobilisierung der Hepatozyten[79]
- Zell-Zellkontakte[80]
- Dreidimensionale Reorganisation[81]
- Interaktion von Hepatozyten und Extrazellulärmatrix[82, 83]
- Einsatz von Wachstumsfaktoren[84, 85]
- Einsatz von Hormonen[86]

Tabelle 4: Meilensteine in der Entwicklung hybrider Leberunterstützungssysteme nach Busse 1999[87]

Jahr	**Entwicklung**
1956	Einführung von Dialysatoren in die Therapie des ALF
1969	Enzymatische Zellisolierung durch Berry
1972	Modifizierung und Verbesserung der enzymatischen Zellisolierung durch Seglen
1975	Nutzung von Dialysefiltern und Hohlfaserkapillaren für die Kultivierung von Hepatozyten durch Wolf
1977	Eisenman el al. erproben die Nutzung einer Hepatozytensuspension vom Schwein in einem Cuprophan-Flachbrett-Dialysator (cut-off 5-10 kDa). Die Hepatozyten zirkulieren durch das Blutkompartment des Dialysators, das Blut der Versuchstiere (12 anhepatische Schweine) wird durch den Dialysatraum geleitet.
1983	Margulis et al. führen an 59 Patienten im Leberversagen eine Perfusion von Schweinehepatozyten durch.
1987	Matsumara et al. verwenden eine zuvor kryokonservierte Hepatozytensuspension von Kaninchen in einem Flachbett-Dialysator bei einem Patienten im Endstadium einer chronischen Lebererkrankung.
1993	Sussman et al. erproben klinisch humane Hepatoblastomzellen in einem Kapillarhohlfaser-Dialysator.
1994	Gerlach stellt einen komplexen Kapillarhohlfaserbioreaktor vor, der speziell zur Kultivierung primärer Hepatozyten entwickelt wurde.
1996	Williams et al. führen die erste randomisierte klinische Studie zur Effektivität hybrider Systeme mit Tumorzellen durch.
1997	Demetriou et al. führen im Rahmen einer Phase-I-Studie eine multizentrische Untersuchung eines hybriden Leberunterstützungssystems mit Schweinehepatozyten durch.

1.8 Indikation für die extrakorporale Leberunterstützung

Ziel der extrakorporalen Leberunterstützung ist es, die Komplikationen des ALF zu beherrschen. Im Idealfall kann die Leberfunktion so lange ersetzt werden, bis eine Regeneration des geschädigten Organs stattgefunden hat.[88] Mit zunehmender Bedeutung der Transplantation als

erfolgreicher Therapie des ALF kommen weitere Indikationen für die hLUS hinzu:

- Überbrückung der Leberfunktion bis zum Eintreffen eines Spenderorgans
- Verbesserung und Stabilisierung des präoperativen Zustands
- Prognosesicherung und Ausschluß von Übertransplantationen
- primäre Unterfunktion des Transplantates (primary graft poor function) oder Transplantatversagen (primary graft failure)

Darüber hinaus besteht der Bedarf für eine Leberunterstützung bei:

- akutem Organversagen bei chronischer Leberinsuffizienz
- Leberteilresektion mit Resektatmangelfunktion
- akutem Organversagen bei angeborenen Stoffwechselstörungen im Kindesalter

1.9 Beurteilung der Stoffwechselaktivität hybrider Leberunterstützungssysteme anderer Arbeitsgruppen

1.9.1 Arbeitsgruppe Demetriou[89, 90]

Die Arbeitsgruppe benützt ein hybrides, extrakorporales Leberunterstützungssystem, das ca. 50g kryokonservierte Hepatozyten vom Schwein enthält, die auf kollagenbeschichteten Microcarriern immobilisiert wurden. Die Viabilität der Zellen wird mit 60-70% angegeben; das bedeutet, daß ein Modul maximal 30g lebende Zellen enthalten kann. Zwei Aktivkohlefilter sind in den Reaktorkreislauf geschaltet. In Tierversuchen wurde die biochemische Stoffwechselaktivität des Systems in einer kontrollierten Studie an Hunden durch stündliche Messungen nachgewiesen.[91] Seit 1993 wurden 33 Patienten mit dem System behandelt, bei denen die Stoffwechselaktivität des Bioreaktors durch Konzentrationsdifferenzen biochemischer Parameter wie Glucose, Harnstoff, Ammonium und Bilirubin im Plasma der Patienten vor und nach der 6-18 Stunden dauernden Behandlung festgestellt wurde.[92] Die Bioreaktormodule wurden nach sechs Stunden Behandlungsdauer gewechselt. Aus den Angaben der Autoren läßt sich bei den geschilderten Ergebnissen nicht zwischen metabolischer Leistung des Systems und den Effekten der weiteren Therapiemaßnahmen sowie spontanen Stoffwechseländerungen der Patienten unterscheiden. In einem Bericht der Autoren 1994 über die ersten sieben behandelten Patienten wurden folgende Effektparameter für die Aktivität des Systems genannt.[93]

Tabelle 5: Effektparameter für die Bioartificial Liver BAL, Rozga 1994

Parameter	**vor Behandlung**	**nach Behandlung**	**Wahrscheinlichkeits-koeffizient**
Hirndruck in mmHg	23,0 ± 2,3	7,8 ± 1,7	$p < 0,005$
NH3 in µmol/l	163,3 ± 21,3	112.2 ± 9,8	$p < 0,01$
Enzephalopathieindex	0,60 ± 0,17	1,24 ± 0,22	$p < 0,03$

Es werden keine Aussagen über Begleitbehandlungen mit senkendem Einfluß auf den Hirndruck gemacht, wie z. B. Mannitolinfusionen, Hochlagerung des Oberkörpers, Hyperventilation oder andere, die zur Standardbehandlung des akuten Leberversagens gehören. 1999 berichten Demetriou et al.[94] über acht Patienten, die nach den King's College-Kriterien ein acetaminopheninduziertes, akutes Leberversagen hatten, das ohne Transplantation mit einer Mortalität von über 90% einhergeht. Drei Patienten wurden mit dem System bis zur Transplantation überbrückt, fünf erlebten eine spontane Erholung der eigenen Leberfunktion.

1.9.2 Arbeitsgruppe Sussman, Kelly[95]

Mit dem hybriden Leberunterstützungssystem der Arbeitsgruppe Sussman, Kelly wurden 23 Patienten behandelt. Im Gegensatz zu allen anderen Systemen basiert dieses System auf der Nutzung einer humanen C3A Hepatoblastomzellinie (HepG2). Vollblut wird mit einem Fluß von 150-300 ml/min durch einen Kapillarhohlfaser-Dialysator perfundiert. Der Vorteil der humanen Hepatoblastomzellinie ist, daß die Zellen in-vitro proliferieren und gut im Dialysator kultivierbar sind. Einen Nachteil stellt die Gefahr einer möglichen Metastasierung dar. Die Autoren weisen auf eine physiologische metabolische Aktivität und kontaktinhibiertes Wachstum der Zellinie hin, veröffentlichte Daten gibt es jedoch kaum. Die Arbeitsgruppe von Nyberg verglich die Stoffwechselaktivität einer anderen HepG2-Zellinie mit der primärer Rattenhepatozyten und fanden eine deutlich höhere Aktivität bei der Nutzung der primären Zellen.[96]

1.9.3 Arbeitsgruppe Margulis[97, 98]

In den Jahren 1983-1988 wurden 59 Patienten im Rahmen einer kontrollierten Studie mit einem Leberunterstützungssystem behandelt. $4x10^7$ Zellen, das entspricht ca. 0,68g, wurden nach Isolierung in PVC-Kapseln gepackt und bei einem Fluß von 80-100 ml/min mit Vollblut perfundiert. Folgende Daten für die biochemische Stoffwechselaktivität des Systems liegen vor:

Tabelle 6: Biochemische Effektparameter aus der Arbeitsgruppe Margulis

Parameter	**Vor Therapie**	**Nach Therapie**
Freies Bilirubin	401±202 µmol/l	45,5±12,3% (182,4±49,3 µmol/l)
NH_3	1203±176,3 µmol/l	50,3±9,3% (605±11,9 µmol/l)
Phenole	500±200 µmol/l	42,3±15,3% (211,5±76,5 µmol/l)

Ähnlich wie in den Ansätzen anderer Arbeitsgruppen werden bei dieser Methodik alle Stoffwechselveränderungen des Patienten im Zeitraum der Therapie dem Bioreaktor zugeschrieben. Es gibt keine Beschreibung der übrigen Einflußfaktoren, so daß eine differenzierte Betrachtung der Stoffwechselaktivität nicht möglich ist. Die verwendete Zellmasse steht im Widerspruch zu den angegebenen Effekten.

Biochemische Daten wurden nur aus der Effektgruppe veröffentlicht, die entsprechenden aus der Kontrollgruppe liegen nicht vor. Der Verteilungsmodus der Effekt- und Kontrollgruppe wird nicht erwähnt. Bei einem Vergleich der beiden Gruppen fällt auf, daß der Anteil der Patienten mit einer Enzephalopathie Grad III-IV in der Kontrollgruppe mit 44,7% höher ist als in der Effektgruppe mit 33,9%. Die Verteilung der Ätiologie unterscheidet sich ebenfalls.

1.10 Fragestellung der eigenen Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, anhand biochemischer Parameter Auskunft über die Stoffwechselleistung porciner Hepatozyten während einer temporären, extrakoporalen Leberunterstützungstherapie zu erhalten. Nur bei vorhandener biochemischer Stoffwechselleistung der Hepatozyten kann von einem positiven Effekt der Therapie auf den Patienten ausgegangen werden. Im Rahmen einer Verlaufskontrolle ist es außerdem notwendig, die Stoffwechselleistung der Hepatozyten während der Therapie durch schnell verfügbare Parameter zu kontrollieren, um die Entscheidung zu treffen, mit der Therapie fortzufahren oder sie gegebenenfalls rechtzeitig abzubrechen. Die erhobenen Daten dienen ferner der Optimierung und Weiterentwicklung des Systems. Dazu ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Kann das hybride Leberunterstützungssystem im klinischen Einsatz eine meßbare Stoffwechselaktivität erbringen?
- Hat die erbrachte Stoffwechselaktivität einen Effekt auf die Stoffwechsellage des Patienten?
- Gibt es schnell zu bestimmende Parameter, die eine Aussagekraft über die Stoffwechselaktivität der Hepatozyten während der Therapie besitzen?

Als Voraussetzung für die zu findenden Parameter gilt, daß sie schnell verfügbar sein müssen. Darüber hinaus sollten sie in direktem Zusammenhang mit dem Krankheitsbild stehen. Von Interesse wäre ein Bezug zu der lebensbedrohenden Enzephalopathie, deren Ursache bei akutem Leberversagen noch nicht komplett geklärt ist. Die Schwierigkeit dieser Aufgabe verdeutlicht, daß bei der Wahl der zu untersuchenden Parameter Kompromisse eingegangen werden müssen.

Zur Erörterung oben genannter Fragestellungen wurden bei sieben Patientenbehandlungen die Plasmaspiegel von Ammonium, Harnstoff, Glutamin, Glucose, Laktat bestimmt und Bilanzierungen für die eingesetzten Bioreaktoren vorgenommen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Beschreibung des Leberzellreaktors

Bei dem hybriden Leberunterstützungssystem hLUS stehen der Leberzellreaktor und die Hepatozytenkultur im Zentrum der Betrachtung. Die Hepatozytenkultur befindet sich in dem Bioreaktor. Durch den Bioreaktor ist es möglich, die Zellkultur über mehrere Wochen in einem dreidimensionalen Zellverband in Funktion zu halten. Der Bioreaktor hängt freibeweglich in einem durchsichtigen Plexiglasgehäuse, das auf zwei Dialysemonitorrohlingen steht. Ein Dialysemonitor dient der Plasmapherese während der Therapie, der andere dient der Rezirkulation von Mediumflüssigkeit in den Bioreaktor. Die Gesamtapparatur ist rollbar und kann somit problemlos zum zu behandelnden Patienten gebracht werden (siehe Abb. 2).

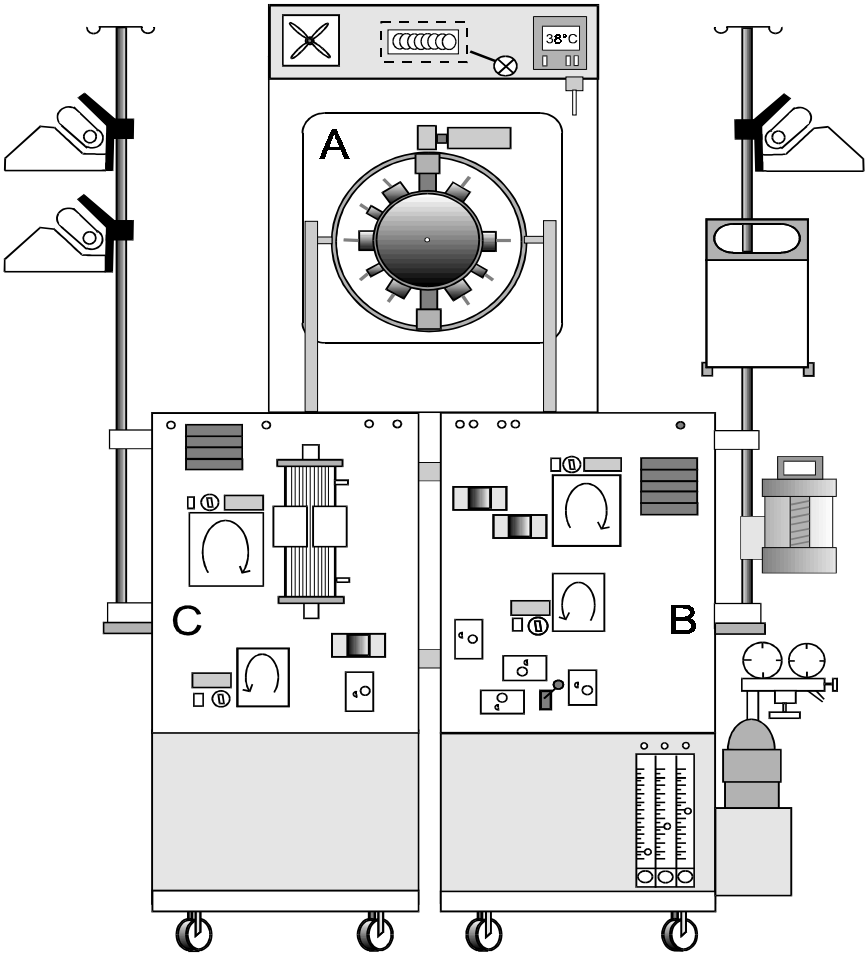

Abb. 2: Schematische Darstellung des hLUS. A. Bioreaktor mit Schutzgehäuse und Erwärmungsvorrichtung. B. Bioreaktormonitor mit Gasversorgung und Pumpen für den Bioreaktorkreislauf. C. Patientenmonitor zur Plasmagewinnung.

Der Bioreaktor besteht aus einem Netzwerk von Kapillarhohlfasermembranen, die von einem

Polyurethangehäuse umgeben sind (PU-R725, Fa. Morton, Bremen). Das Kapillarbündel setzt sich aus miteinander verwobenen semipermeablen Membranbündeln (jeweils ca. 3000 Einzelkapillare) zusammen, die den Innenraum des Bioreaktors in ein extrakapilläres und intrakapilläres Kompartiment teilen. Die eingefüllten Hepatozyten adhärieren an der Oberfläche der Kapillaren. Jedes Membranbündel kann über zwei eigene Eintrittskappen zum Bioreaktorgehäuse durchströmt werden. Zwei der drei Kapillarbündel dienen dem Mediuman- und -abtransport in der Zellkulturphase bzw. dem Plasmadurchfluß während des klinischen Einsatzes des Bioreaktors. Die Bündel bestehen aus Polyethersulfon (PES, Fa. Akzo, Wuppertal) mit einem NMWCO (normal molecular weight cut off) von 200.000 Da. Die Gesamtaustauschfläche für Flüssigkeiten errechnet sich aus der Summe der Innenoberflächen aller Einzelkapillare eines Bündels und beträgt beim Reaktor ca. 0,55m².

Das dritte Kapillarbündel (hydrophobe Oxygenierungsmembranen der Firma Mitsubishi, Tokio, Japan), welches waagerecht durch die PES-Bündel verläuft, dient der Sauerstoffversorgung der im Reaktor befindlichen Hepatozytenkultur. Diese etwa 10000 Einzelkapillare bilden eine Gasaustauschfläche von ca. 2,42 m². Eine eigene Einlaufkappe an der Oberfläche des Reaktors, von der offen endende Silastikkapillare in den Reaktor führen, ermöglicht die Beimpfung des extrakapillären Kompartiments mit Hepatozyten. Nach der Beimpfung dient dieser Zugang der Druckmessung im Reaktorinnenraum.

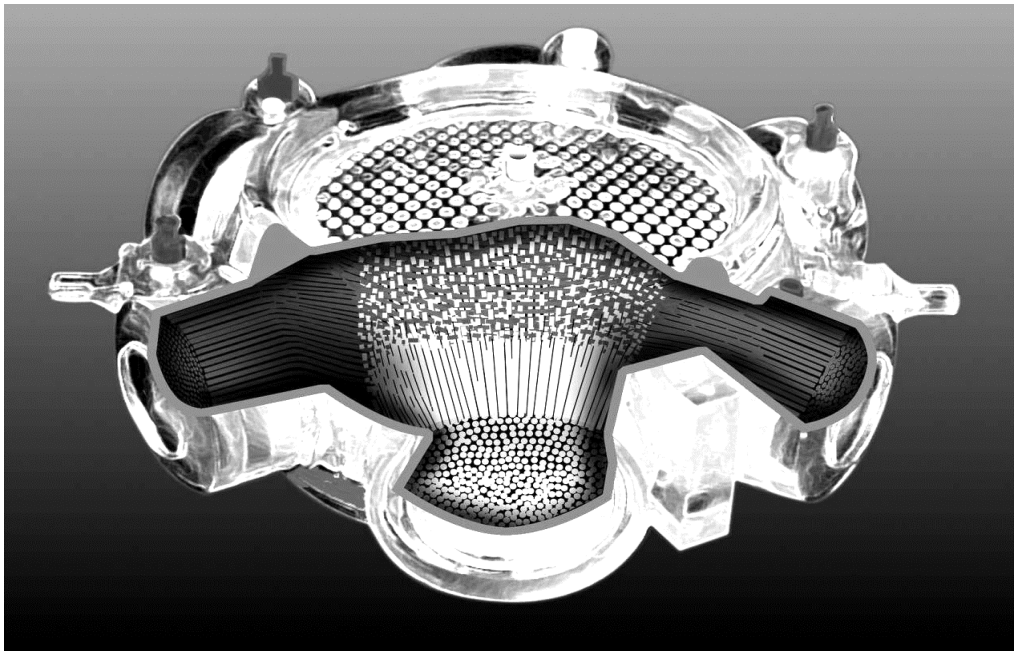

Abb. 3: Schematische Darstellung des Kapillarnetzwerkes

Der hier gewählte Aufbau des Bioreaktors dient folgenden Funktionen:

1. Der Adhäsion der Hepatozyten in einem eigenem Kompartiment (extrakapillär)
2. Der Möglichkeit einer Reorganisation der Zellen in einem dreidimensionalen Zellverband (in etwa den physiologischen Leberverhältnissen entsprechend)
3. Der vollständigen Flüssigkeitszirkulation durch das Leberzellkompartiment mittels der voneinander unabhängigen Kapillarbündel, von denen eines dem Flüssigkeitsantransport und das andere dem Flüssigkeitsabtransport dient
4. Durch das Verweben der Kapillarbündel werden im Bioreaktor kurze Stofftransportstrecken ermöglicht.
5. Die benötigte und ausreichende Sauerstoffversorgung der Hepatozytenkultur wird durch die im Reaktor integrierten Gasaustauschflächen sichergestellt.

Die für die Hepatozytenkultur wichtige Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes geschieht über eine ins Zellkompartiment eingeleitete trockene Gaszufuhr aus Sauerstoff, CO_2 und Druckluft, in Abhängigkeit zum aktuellen pH-Wert. Die Basismischung der oben erwähnten Gase beträgt 45% Druckluft (Hausanlage), 50% Sauerstoff (AGA 0.1) und 5% Kohlendioxid (AGA 5.0, AGA Gas GmbH Hamburg).

Für die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur von 39ºC ist der Bioreaktor von einem 8 mm Acrylglasgehäuse umgeben, das mittels eines Tangentialheizgebläses (230 V/50 Hz) mit ca. 80 m^3/h Luft nach dem Umwälzprinzip ventiliert wird. Ein Leistungsmodul (Fa. Kemo, Berlin) läßt eine Regulation der Heizleistung von max. 1000 W zu. Die Messung der Ist-/Soll-Temperatur erfolgt über eine im Gehäuse angebrachte Meßsonde (Typ PT 100 RS Components, Mörfelden-Walldorf), deren Werte über einen im Acrylglasgehäuse integrierten, digitalen, selbstoptimierenden Regler (CAL 9900 RS Components, Mörfelden-Walldorf) angezeigt, reguliert und korrigiert werden können.

Die Basis der Perfusionseinrichtungen zum Reaktor und zurück bilden zwei miteinander gekoppelte Dialysemonitorrohlinge (HD-Secura, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen), die aufgabenspezifisch modifiziert sind und als Apperateträger für Pumpen, Klemmventile, Druckanzeigen, Steuerelektronik, Plasmafilter, Perfusoren und alle weiteren Systemkomponenten dienen.

2.2 Sicherheitsfunktionen des Bioreaktors

Um physiologisch angepaßte Drücke und Volumenströme zu erreichen, finden Schlauchpumpen mit Zahnriemengetriebe (Typ 49 V, 437, 348 und 260 Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) Verwendung. Unter Berücksichtigung der in den einzelnen Zirkulatinskreisläufen maximal

notwendigen Volumenströme sind für Blutzuführung und Reaktorkreislauf die Pumpen mit einer Förderleistung von maximal 600ml/min, beziehungsweise für den Plasma-Medium-Zu-/Ablauf Pumpen mit einer Maximalleistung von jeweils 200 ml/min dimensioniert. Der Förderfluß aller Pumpen ist von Null bis zum jeweiligen Maximalfluß stufenlos manuell regulierbar und über einzelne LCD-Displays ablesbar. Zur Vermeidung von Druckspitzen und unphysiologischen Strömungsverhältnissen, die unter Umständen zum Bersten beziehungsweise Kollabieren des Bioreaktors und der Perfusionsleitung führen könnten, sind in den einzelnen Perfusionskreisläufen Druckaufnehmer (Typ BV 49 B 90 Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) positioniert. Mit ihnen ist es möglich, druckgeregelt die einzelnen Arbeitszustände der Pumpen aufeinander abzustimmen und bei Überschreitung definierbarer Grenzwerte gegebenenfalls abzuschalten. Ablesung des Ist-Wertes und Einstellungen der Schaltergrenzwerte erfolgen über separate Druckanzeiger (Typ 49 V189 Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen), die in den jeweiligen Monitoren installiert sind. Als druckstabile Leistungen werden Combidynschläuche (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet. Diese verbinden Expansionskammern (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit den jeweiligen Druckaufnehmern auf den Monitorplatten. Das Leitungssystem wird durch Sterilfilter (Minisart Fa. Satorius AG, Gotischen) geschützt.

Der Patientenmonitor gibt somit Aufschluß über den Blut-Ansaugedruck, Prä-Plasmafilterdruck, Plasmafilterdruck und Blutrücklauf.

Der Reaktormonitor zeigt die Druckverhältnisse vor Reaktorpassage (Prä), Reaktorinnendruck (Intra) und nach Reaktorpassage (Post) an.

Zur Vermeidung von Luftembolien des Patienten beziehungsweise des Reaktorkapillarsystems sind in der Expansionskammerhalterung der zum Patienten zurückführenden Blutleitung und der Bioreaktorkreislaufpumpe Luftdetektoren (Typ SAD BV 49 LKL, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) installiert.

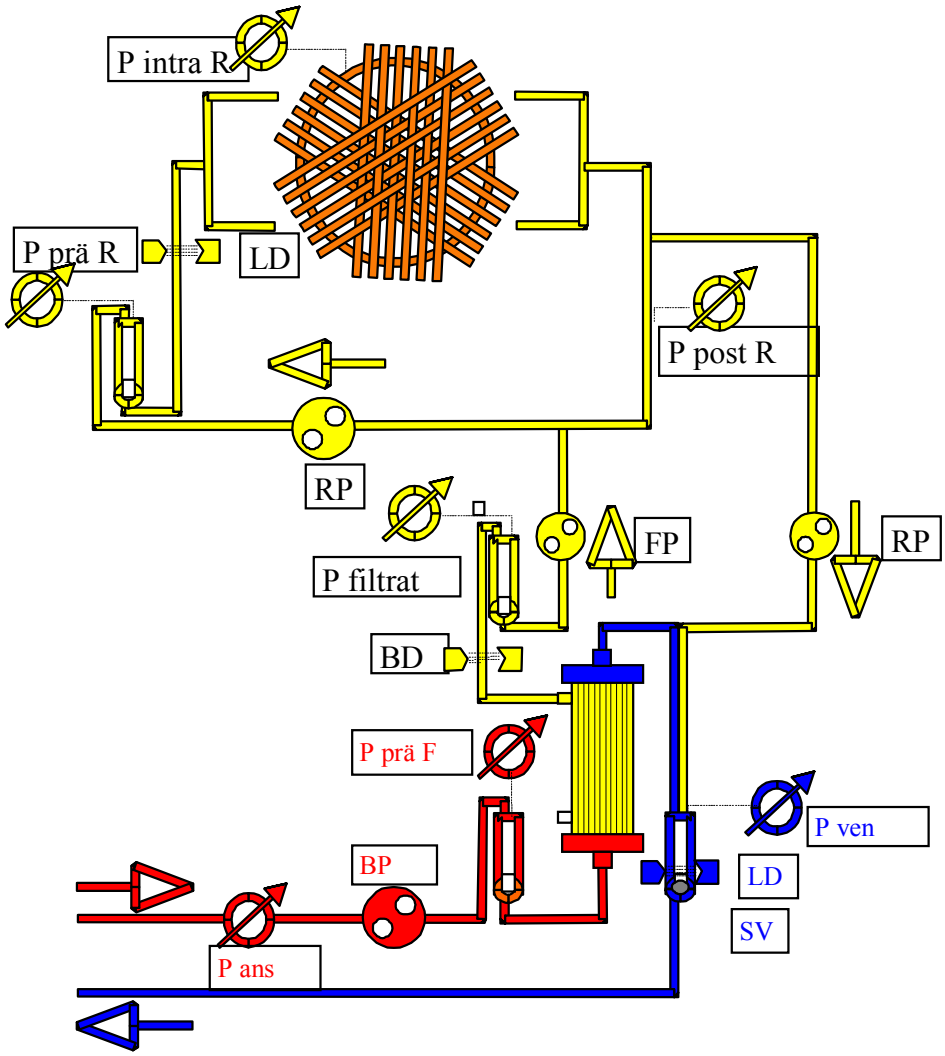

Abb. 4: Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs. P = Druckmessung, LD = Luftdetektor, SV = Sicherheitsventil, BP = Blutpumpe, RP = Reaktorpumpe, FP = Filtratpumpe

Im Alarmfall bewirken Klemmenventile (Typ 49 V 229 Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) eine Kompression der in die Klemmführung eingelegten Schlauchsysteme. Die Blutpumpe arbeitet druckgeregelt. Grenzwerte der Druckmessung für Blut-Ansaugdruck, Prä-Plasmafilterdruck und Blutrücklaufdruck schalten die Schlauchpumpe unter folgenden Bedingungen ab: Blut-Ansaugdruck > -100 mmHg, Prä-Plasmafilterdruck > 200 mmHg, Blutrücklauf > 100 mmHg. Die Filtratpumpe des Patientenmonitors soll nur bei intaktem Plasmafilter arbeiten. Es muß ein Filtratdruck >10 mmHg anliegen, damit die Filtratpumpe ihre Arbeit aufnimmt. Mit diesen Maßnahmen werden eine Schädigung der Blutbestandteile, Kollabieren und Drucknekrose der Patientenvenen verhindert. Um ein Bersten der Leitungssysteme und Bioreaktoren zu vermeiden, ist der Grenzwert für den Prä-Reaktordruck bei 250 mmHg, für den Reaktorinnendruck mit 120 mmHg definiert. Bei Überschreiten dieser

Grenzwerte stoppt die Reaktorkreislaufpumpe. Einem Volumenrückstau und einer Regurgation von Plasma/Medium entgegenwirkend, findet bei Überschreitung des Post-Reaktordruckes von 15 mmHg eine Aktivierung der Ableitungspumpe statt.

2.3 Systemaufbau

Die einzelnen Bestandteile des Reaktorkreislaufs (Bioreaktor, Schlauchsysteme, Blasenfallen, Druckmeßleitungen, Bakterienfilter, 3-Wege-Hähne, Konnektoren, Adaptoren) werden als gassterilisierte, folienverschweißte Einmalartikel geliefert. Der Zusammenbau erfolgt unter sterilen Arbeitsbedingungen nach Herstellervorschrift in einer Laminar-Air-Flow-Werkbank (Fa. Heraeus Instruments). Das geschlossene System wird in die Perfusionseinheit integriert: Der Bioreaktor wird in Halterungen im Plexiglasgehäuse festgeschraubt, der Silastikabschnitt des Kreislaufs in die Rollerpumpe der Kreislaufzirkulation bzw. der des Mediumzulaufs in die Fingerprint-Pumpe der Mediumzufuhr eingelegt. Die wird Gaszuleitung an den Anschluß der Gasmischeinheit, und die Druckübertragungsschläuche werden an die Drucksensoren angeschlossen. Anschließend wird der Kreislauf mit 1,2 l NaCl-Lösung 0,9% befüllt und entlüftet. Es erfolgt eine Umwälzung des Volumens über die Kreislaufpumpe bis zum Austausch der Kochsalzlösung durch Kulturmedium am Tag der Zelleinfüllung. Nach Einstellung des pH-Wertes über die Gasmischung auf pH 7,38 – 7,42 ist der Bioreaktor für das Einbringen der Zellen vorbereitet.

2.4 Spendertiere

Für die Leberzellisolierung werden Schweine aus der Versuchstierhaltung der Charité verwendet, die unter pathogenfreien Bedingungen gefüttert, gehalten und transportiert werden. Vor der Organentnahme werden die Tiere individuell auf bakterielle und virale Erreger von Zoonosen untersucht.

Ausschluß von Zoonosen:

Tabelle 7: Ausschluß von Zoonosen

Bakteriell	**Viral**
Leptospira	Influenza A
Brucella	Influenza B
Salmonella paratyphi OH, H, O	Rotavirus
Salmonella typhi H, O	Pseudorabies
Salmonella typhimurium	
Yersinia enterocolitica	
Yersinia pseudotubercularis	
Francisella tularensis	

Die Tiere werden als Jungtiere zur Organentnahme genommen, damit die Lebern wenig Bindegewebe enthalten und die Hepatozyten sich besser isolieren lassen. Das Gewicht der für die Therapie verwendeten Spendertiere beiderlei Geschlechts betrug zwischen 12 und 19 kg, das der entnommenen Lebern zwischen 300 und 680g, was einer Ausbeute von 2,2 bis 4,0 x 10^9 Zellen entspricht.

2.5 Organentnahme

Die Prämedikation erfolgt intramuskulär etwa 1 Stunde vor Operationsbeginn mit 3-5 mg/kg KG Azaperon (Stresnil-Janssen, Fa. Janssen, Neuss) und 0,05 mg/kg KG Atropin (Atropinsulfat Braun, Fa. Braun Melsungen, Melsungen). Die Narkoseeinleitung wird über eine Ohrvene mit 0,01 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl-Janssen, Fa. Janssen, Neuss) und 0,3 ml/kg KG Etomidat (Etomidat-Lipuro, Fa. Braun Melsungen, Melsungen) durchgeführt. Als Narkoseverfahren wurde die TIVA gewählt, die mit Repetitionsdosen von 0,07 mg/kg KG Pancuronium (Pancuronium Curamed, Fa. Curamed, Karlsruhe) und einer Dauerapplikation von 0,6 mg/kg KG/h Etomidat (Etomidat-Lipuro, Fa. Braun Melsungen, Melsungen) sowie mit 0,02 mg/kg KG/h Fentanyl aufrecht erhalten wird. Intraoperativ erfolgt die Beatmung des Tieres über einen Trachealtubus mit einem Sauerstoff-Lachgasgemisch in einem Verhältnis von 1:2.

2.6 Zellisolierungsverfahren

Zur Isolierung der Hepatozyten aus der operativ entnommenen Leber wird die enzymatische

Isolierung mittels Kollagenaseperfusion, erstmal beschrieben von Seglen, modifiziert durch Gerlach, als Fünf-Schritt-Methode angewendet. Die zu dem Prozeß erforderlichen fünf Lösungen (Fa. Biochrom, Berlin) werden steril geliefert und bei 4° C gelagert. Sie enthalten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 8: Zusammensetzung der Zellisolationslösungen

Lösung A	Phosphatgepufferte Na^+ - Cl^- -K^+ - Lösung (= PBS) ohne Calcium/Magnesium, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphotericin B und 2% EDTA-Lösung
Lösung B	PBS ohne Calcium und Magnesium, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphotericin B, 1% $NaHCO_3$-Lösung und 1% Glukose 10%
Lösung C	Medium 199 mit HEPES (N-2 Hydroxyethylpiperacin-N-2-Ethansulphon-Säure, 1% Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B)
Lösung D	Medium 199 mit $NaHCO_3$, oder Williams-E-Medium mit $NaHCO_3$, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphotericin B und 0,03% Kollagenase (Fa. Biochrom, Berlin).
Lösung E	Medium 199 mit HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin B

Die Leber wird nach Explantation in eine sterile Stahlschüssel des Zellisolierungswagens gegeben. Der Zellisolierungswagen besteht aus einem Perfusionsmonitor (Bestandteile: Schutzgehäuse, 3 Rollerpumpen für die Leitungen der V. portae, der A. hepatica und des Abflußes, Schüsselhalterung, Wärmetauscher auf 42° C eingestellt), einem Sterilcontainer (Inhalt: Schläuche für die Porta- und Arterienperfusion, Abfallsleitung, doppelwandiges Glasgefäß mit Metallhalterung, Schüssel- und Glasgefäßerwärmung) und einer Metallschüssel mit Sieb. Der Schlauch für die Portaperfusion wird mit dem einen Ende über den Ablaufzylinder der Schüssel gestülpt und mit dem anderen an die kanülierte V. portae angeschlossen. Analog wird der Schlauch der Arterienperfusion mit dem entsprechende Gegenstück der Schüssel verbunden und mit dem freien Ende an die ebenfalls kanülierte A. hepatica des Organs angeschlossen. Die Leitung für die Portaperfusion gibt einen Zweig ab, der in einem Abfallgefäß endet; dadurch wird erreicht, daß das Systems mit jeder Lösung perfundiert wird. Alle drei beschriebenen Schläuche werden in die entsprechenden Rollerpumpen eingelegt. Die verschiedenen Lösungen werden, der Reihe nach, in den Metallcontainer gegossen, in dem die Leber liegt, und durchfließen das Organ.

Die Perfusion erfolgt flußgesteuert über die V. portae mit einem Fluß von etwa 2 ml/min/g Lebergewebe, entsprechend einem Gesamtfluß zwischen 500-800 ml/min und druckgesteuert über die A. hepatica mit einem Mitteldruck von 80 mmHg, entsprechend einem physiologischen Fluß von etwa 0,5 ml/min/g Lebergewicht. Der erreichte Gesamtfluß ist vom Organgewicht abhängig und kann bis zu 1000 ml/min reichen. Die Perfusion des Organs mit Lösung A beginnt bereits in situ und dauert 5 Minuten. Dadurch werden das Freispülen von Blut und das Entfernen von Calcium erzielt. Danach wird die mobilisierte Leber in die Perfusionsapparatur gelegt und an die Perfusion angeschlossen (s.o.). Die darauffolgend rezirkulierende Perfusion mit Lösung B dauert 20 Minuten und erreicht über die Calciumentfernung die Auflockerung der desmosomalen Verbindungen innerhalb der Hepatozyten. Lösung C, im Sinne einer single pass perfusion, setzt die Voraussetzungen für eine optimale Wirkung der Kollagenaseperfusion (Calciumsubstitution, Temperaturoptimum von 37° C). Letztere führt zu einer Aufhebung der bindegewebigen Grundmatrix der Leber und somit zu der eigentlichen Zellisolierung. Anschließend wird die Kollagenase mit der, auf 4° C gekühlten, Lösung E ausgewaschen. Die Zellen werden dann vorsichtig manuell aus der Leberkapsel gelöst. Die entstandene Zellsuspension wird durch 900 µm und 400 µm Edelstahlnetze gesiebt und anschließend bei 4° C gewaschen und in einem Beutel aufgehängt. Dabei setzen sich die Zellen ab und werden später vom Überstand abgetrennt. Dieser Vorgang wird ca. 3-4 mal wiederholt. Die Zellen sind dann zu der Einfüllung in den Bioreaktor bereit.

Die bei der Isolierung erzielte Zellausbeute dient als Marker für die Mikroperfusion und ist damit Ausdruck der Qualität der Perfusionsschritte (Zellausbeute = isoliertes Zellpellet / Ausgangsgewicht der Leber).

2.7 Zellmenge und -viabilität, Quantifizierung der Zellschädigung

Bei der Besiedlung des Bioreaktors mit Hepatozyten wird das Gesamtvolumen der Zellsuspension bestimmt. Durch Inkubation einer Probe der Suspension in einer Neubauer Zählkammer wird lichtmikroskopisch die Zellzahl pro Mikroliter ermittelt. Zu der eigentlichen Viabilitätsbeurteilung wird eine Trypanblau-Färbung der frischen Zellen durchgeführt (100 µl Zellsuspension, 100 µl Trypanblau-Lösung 0,5 % : Firma Sigma, NaCl 0,9 %). Die Zellviabilität wird in Prozent der nicht gefärbten Zellen anteilig zu den insgesamt ausgezählten Zellen angegeben.

2.8 Kulturmedium

Die Kultur erfolgte unter Verwendung eines serumfreien, hormondefinierten Mediums. Als Ausgangsrezeptur wurde Williams E-Medium verwendet (Standard in der Hepatozytenkultur).

Im Gegensatz zur Origanalrezeptur wurden weitere essentielle Spurenelemente, Fettsäuren (Arachidonsäure) und Vitamine (Pyridoxal.HCl, Calciferol) ergänzt. Neben der Glucose wurden Fructose und D-Galactose als weitere Kohlehydrate ergänzt. Als Aminosäure wurde Ornithin hinzugefügt, die Konzentration folgender Aminosäuren (alle L-Form) wurde erhöht:

- Arginin, Phenylalanin, Serin, Tryptophan, Tyrosin: 10x
- Histidin: 5x
- Glycin, Leucin, Methionin, Prolin, Threonin: 3x
- Alanin, Valin: 2x

Die Hormone Dexamethason, Insulin und Glucagon wurden zugefügt.

Als Puffer enthielt das Medium 2,8 g/l NaHCO3.

Die Konzentrationen einzelner wesentlicher Inhaltstoffe betrugen:

Na^+ 130 mmol/l; Cl^- 110 mmol/l; Glucose 8,33 mmol/l

Eine komplette Liste der Konzentrationen aller Inhaltstoffe sind dem Katalog der Firma Biochrom AG, Berlin, Germany, Seite 83-84, Heparmed-Medium für Leberzellen, zu entnehmen.

Die Kulturen erfolgten serumfrei. Lediglich zu Beginn der Kulturen am ersten Tag wurden einmalig 100 ml Plasma des Spendertieres den Kulturen zugefügt.

2.9 Zelleinfüllung

Die bei der Zellisolierung gewonnene Zellsuspension wird zur Minimierung der anoxischen Schädigung hypotherm zur Einfüllung in den Bioreaktor transportiert. Die Zellsuspension wird über ein Schlauchsystem mittels 3-Wege-Hahn über das Zelleinfüllungssystem in den Bioreaktor gefüllt. Durch wiederholtes Schwenken des Bioreaktors um zwei Achsen bis nach Beginn der Adhäsionsphase der Hepatozyten (6-8 h) wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Intra-Kompartiment erreicht. Nach Ende der Zelleinfüllung dient die Zugabe von 200-300 ml Plasma des Spendertieres, durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen und leukozytenfiltriert, der Supplementierung mit Hormonen und Substraten des tierischen Organismus. Eine Antikoagulation ist durch kontinuierliche Infusion von 100 I.E. Heparin (Liquemin N 25000, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen) pro h über 24h gewährleistet.

2.10 Der Zellkulturbetrieb

Der Zellkulturbetrieb gewährleistet die Erhaltung der Vitalfunktionen der Zellkultur und die ständige Bereitschaft zur Therapie.

2.10.1 Einstellungen

Die Einstellungen werden so gewählt, daß der Prä-Druck 250 mmHg nicht überschreitet und der Intradruck 0 bis 60 maximal 120 mmHg beträgt. Zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Dauerperfusion bedarf es eines Mindestflusses von 50 ml/min, der unter Beachtung obiger Druckgrenzen bis zu einem Maximalfluß von 300 ml/min gesteigert werden kann. Umstände, die einen Betrieb des Reaktors mit einer Flußgeschwindigkeit unter 50 ml/min nötig machen, haben eine Beendigung des Zellkulturbetriebs zur Folge.

Die O_2-, CO_2-, und Druckluftgaseinstellung wird an der Gasmischbox des Bioreaktors getrennt vorgenommen, so daß der pH sich in den Grenzen von 7,35 und 7,45 und der pO_2 sich zwischen 200 und 260 mmHg bewegt. Die Höhe der Drucklufteinstellung bestimmt die Verweildauer der Gase im Reaktor. Basal wird ein Druckluftfluß von 200 ml/min, ein Sauerstoffluß von 20 ml/min und ein Kohlendioxidfluß von 2 ml/min eingestellt.

Die Einspeisung von frischem Kulturmedium in den Kreislauf erfolgt am ersten Tag mit einer Geschwindigkeit von 200 ml/h über eine Mediumpumpe. Am zweiten Tag wird sie auf 100 ml/h reduziert und ab dem vierten Tag noch einmal auf 50 ml/h. Die Mediumzufuhr gewährleistet eine kontinuierliche Auffrischung des zirkulierenden Mediums.

Die Temperatur im Bioreaktorgehäuse auf konstant 39° C eingestellt. Sie wird durch eine thermostatgesteuerte Heizvorrichtung aufrechterhalten.

Der Zellkulturbetrieb umfaßt eine regelmäßige Kontrolle und Protokollierung der Pumpraten, Druckwerte, Gaseinstellungen und Blutgasanalysen. Bei Abweichungen erfolgen nach einer sorgfältigen Analyse entsprechende Interventionen, die wiederum eine Kontrolle notwendig machen.

2.10.2 Funktions- und Qualitätsabschätzung der Zellkultur

Um die Zelleistung oder das Ausmaß einer Zellschädigung einschätzen zu können, wird während des Stand-by-Betriebs eine biochemische Verlaufskontrolle durchgeführt. Aus den täglich abgenommenen Proben werden Parameter des Stoffwechsels bestimmt, die Rückschlüsse auf die Zellintegrität erlauben.

Zu den täglich bestimmten Parametern gehören:

Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Phosphat, Glucose, Harnstoff, AST, LDH, GLDH, abgenommen mit einer Plasmamonovette mit einem Volumen von 5 ml, Ammonium, ebenfalls mit einer Plasmamonovette mit einem Volumen von 5 ml und Laktat mit einer EDTA-Monovette mit einem Volumen von 2 ml. Alle drei Tage werden zusätzlich mit einer Serummonovette 5 ml

zirkulierendes Medium abgenommen, um die Osmolalität zu bestimmen. Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe einer Datenbank.

2.10.3 Leberfunktionstests und Stoffwechselleistung

Mit Hilfe von Leberfunktionstests (LFT) erfolgt die Beurteilung der Stoffwechselleistungen der Hepatozyten. Es werden unterschiedliche Testsubstanzen kontinuierlich zusammen mit dem Nährmedium in den Reaktorkreislauf eingebracht. Die Testsubstanzen werden vor dem Anschluss eines neuen Mediumbeutels unter sterilen Bedingungen mit folgenden Zielkonzentrationen in diesen eingespritzt:

Tabelle 9: Leberfunktionstests

Lidocain (Lidocain 1%, Apotheke des Virchow-Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin)	6 mg/l
Sorbitol (Sorbitol 40%, Fa. SerumWerk Bernburg AG, Bernburg)	1 g/l
Galaktose (Galaktose 25%, Apotheke des Virchow-Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin)	1 g/l

Kontolliert wird die gleichmäßige Zugabe von den LFT-Testsubstanzen durch Abnahme von Mediumleerwerten aus den Mediumbeuteln. Weiterhin wird die Hepatozytensyntheseleistung durch Bestimmung von Schweinealbumin erfaßt.

2.10.4 Protokollierung

Alle Parameter, die am Reaktormonitor erhoben werden, BGA-Ergebnisse, Perfusionsmodus sowie sämtliche Interventionen werden in Protokollen festgehalten und anschließend in eine Datenbank eingegeben.

2.11 Voraussetzungen für den klinischen Einsatz und Therapieplanung

Unmittelbar nach der Benachrichtigung über einen eventuellen Therapieeinsatz in der chirurgischen Klinik muß der im Zellkulturbetrieb laufende Bioreaktor auf seine Therapiebereitschaft überprüft werden. Die Bewertung der Zellkultur erfolgt aus den täglich erhobenen Daten des Stand-by-Betriebes. Voraussetzungen für eine Verwendung sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 10: Voraussetzungen einer Zellkultur für den Einsatz zur Therapie

Parameter	**Wert**	**Bewertung**
Alter der Zellkultur	>24h; <3 Wochen	Über-/Unterschreitung nur unter Ausnahmebedingung
LDH-Liberation	Anstieg um 50/75/100 I.U. in 24 h bei Mediumzufuhr 200/100/50 ml/h	Kontaminationsverdacht
pH	Abfall um 0,1 Einheiten/h bei unveränderter Gaszufuhr und Zirkulation	Kontaminationsverdacht (gültig nur außerhalb der initialen Adhäsion)
pCO2	Anstieg um 10 mmHg/h bei unveränderter Gaszufuhr und Zirkulation	Kontaminationsverdacht (gültig nur außerhalb der initialen Adhäsion)
NH3	Anstieg über 150 µmol/l basal	Differenzierungs- und Funktionsverlust

2.12 Einschlußkriterien

Einschlußkriterien für die Behandlung mit dem Leberunterstützungssystem waren hyperakutes, akutes oder akutes nach chronischem (acute on chronic) Leberversagen bei gleichzeitiger Indikation für eine Lebertransplantation. Die Patienten müssen eine Enzephalopathie Grad II oder höher entwickelt haben. Das Alter der Patienten muß höher als 15 und niedriger als 60 Jahre sein. Folgende Grenzwerte wurden bei den klinischen Parametern als Voraussetzung für eine Therapie gesetzt:

1. Quick < 20%
2. SerumAmmonium > 100 µmol/l
3. Bilirubin > 85,5 µmol/l
4. Enzephalopathie > Grad II.

2.13 Ausschlußkriterien

Ausschlußkriterien für die Therapie sind Leberversagen ohne Indikation für eine Transplantation bei aktivem Alkoholismus, akute Portalvenenthrombose, Budd-Chiari-Syndrom sowie Leberversagen im Zuge eines Multi-Organ-Versagens, nach chronischer Herz-, Lungen- oder Niereninsuffizienz. Weitere Ausschlußkriterien sind das Vorliegen einer schweren Infektion, einer intracerebralen Blutung, einer bösartigen Neubildung oder einer Schwangerschaft.

2.14 Darstellung der Plasmaseparation

Der Aufbau des Plasmaseparationsystems und der Plasma- Mediumaustausch am Bioreaktorkreislauf erfolgen auf der Intensivstation der chirurgischen Klinik. Vor Beginn der Therapie wird das Nährmedium durch sechs Konserven Heparinplasma (Blutgruppengleich oder AB-Plasma) substituiert. Bei Bedarf werden sie bei –80°C zwischengelagert und erst unmittelbar vor der Therapie aufgetaut. Während der gesamten Therapie erfolgt bei den Patienten eine kontinuierliche Plasmaseparation aus folgenden Gründen:

- Die Konvektion über die zellundurchlässigen Membranen des Bioreaktors kann nur mit Plasma, nicht mit Vollblut geschehen.
- Thrombozytenaggregate im Bioreaktor müssen ausgeschlossen werden.
- Die Plasmaseperation ermöglicht eine Trennung von immunkompetenten Zellen des Patienten und den Hepatozyten im Bioreaktor.

2.15 Therapieüberwachung und Datenerhebung

Die Drücke an sämtlichen Druckmeßpunkten wurden ständig kontrolliert, entsprechend wurde bei Druckanstieg durch Verminderung der Pumpleistungen, Plasmafilterwechsel oder Änderung des Perfusionsmodus reagiert. Die Gaseinstellungen wurden stündlich durch Blutgasanalysen des Plasmas nach Durchfließen des Bioreaktors überprüft. Die ACT wurde stündlich vor Ort bestimmt.

2.16 Bestimmung der Stoffwechselleistung

Um die Konzentrationen der am Bioreaktor gemessenen biochemischen Parameter zu beurteilen, wurden sie mit den Konzentrationen derselben Stoffe zum selben Zeitpunkt im Patienten verglichen. Die absoluten Konzentrationen haben wenig Aussagewert. Es ist wichtig zu wissen, ob und wie sich die Stoffzusammensetzung des Patientenplasmas nach Durchfließen des Bioreaktors verändert hat. Nach Berechnung des Stoffumsatzes, das heißt der Netto-Freisetzung bzw. Netto-Aufnahme bezogen auf ein Zeitintervall, können Rückschlüsse auf die Stoffwechselleistung des Bioreaktors gezogen werden. Neben der Konzentrationsdifferenz eines Stoffes zwischen Bioreaktor und Patient an zwei verschiedenen Zeitpunkten gehen die Filtratflußgeschwindigkeit und die Zeitdifferenz zwischen zwei Meßpunkten mit in die Formel ein. Daraus ergeben sich folgende Überlegungen:

Für

U = Stoffumsatz

F = Filtrationsrate

V = Volumen des Bioreaktorkreislaufs = 1,3 Liter

C_{B1} = Konzentration Bioreaktor zu Meßzeitpunkt 1

C_{B2} = Konzentration Bioreaktor zu Meßzeitpunkt 2

C_{P1} = Konzentration Patient zu Meßzeitpunkt 1

C_{P2} = Konzentration Patient zu Meßzeitpunkt 2

t1 = Meßzeitpunkt 1

t2 = Meßzeitpunkt 2

gilt:

$$U = [F(C_{B1}-C_{P1})e^{-F(t2-t1)/1,3} + F(C_{B2}-C_{P2})] / [1-e^{-F(t2-t1)/1,3}]$$

Für ein Meßintervall von vier Stunden wird der Ausdruck, der durch die Exponentialfunktion beschrieben wird, vernachlässigbar, so daß

$$U=F(C_B-C_P)$$

eine gute Näherung der wahren Verhältnisse darstellt.

Bei allen Modellen gehen wir davon aus, daß sich der Patient in einem Steady State befindet und der Bioreaktor gut durchmischt ist. Bei sehr starken Schwankungen der Patientenspiegel auf der Zeitachse müssen die errechneten Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden, da die Veränderung der Konzentration zeitlich verzögert im Bioreaktor stattfindet, diese Verzögerung aber nicht genau quantifiziert werden kann, weil die Durchmischungsverhältnisse nicht immer bekannt sind und von Bioreaktor zu Bioreaktor variieren. Außerdem kann die Durchmischungsqualität einzelner Bereiche im Reaktorinnenraum durch das Verstopfen von Poren im Verlauf der Therapie abnehmen.

2.17 Bestimmung der Parameter

2.17.1 Bestimmung der Glucose–Konzentration

Die Bestimmung der Glucose–Konzentration findet im Zentrallabor der Charité statt. Die angewandte Methode wird von Thomas[99], Seite 154-166 beschrieben und von der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie empfohlen.

Die Bestimmung der Glucose-Konzentration erfolgt als kinetisch-enzymatischer UV-Test. Glucose wird in Anwesenheit von Hexokinase mit ATP zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses reagiert mit NADP unter Bildung von 6-Phosphogluconat und $NADPH_2$ in Anwesenheit der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Die Meßgröße ist die Geschwindigkeit der $NADPH_2$-Zunahme bis zum Stillstand der Reaktion. Die Zunahme verhält sich proportional zur Glucose-

Konzentration und wird bei 340 nm photometrisch bestimmt. Der Test wird am Technicon DAX 72 (Technicon, Fa. Bayer) mit Reagenzien der Firma Bayer durchgeführt. Die Einheit der Meßwerte ist mg/dl.

2.17.2 Bestimmung der Laktat-Konzentration

Die Bestimmung der Laktat–Konzentration findet im Zentrallabor der Charité statt. Die angewandte Methode wird von Thomas[99], Seite 268–272 beschrieben und von der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie empfohlen.

Die Bestimmung der Laktat-Konzentration erfolgt als kinetisch-enzymatischer Test. Laktat wird durch Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt. Das H_2O_2 bildet dann in einem weiteren Schritt durch Peroxidase einen Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 540nm liegt. Die Meßgröße ist der Absorptionsanstieg bei 540 nm. Der Anstieg verhält sich proportional zur Laktat-Konzentration. Der Test wird am Kodak Ektachem 250 (Fa. Johnson & Johnson) mit Reagenzien der Firma Johnson & Johnson durchgeführt. Die Einheit der Meßwerte ist mg/dl.

2.17.3 Bestimmung der Harnstoff-Konzentration

Die Bestimmung der Harnstoff–Konzentration findet im Zentrallabor der Charité statt. Die angewandte Methode wird von Thomas[99], Seite 422-426 beschrieben und wird von der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie empfohlen.

Die Bestimmung der Harnstoff-Konzentration erfolgt als kinetisch-enzymatischer UV-Test. Nach enzymatischer Hydrolyse des Harnstoffs durch Urease wird der gebildete Ammonium mit 2-Oxoglutarat und $NADH_2$ zu Glutamat, NAD und Wasser mittels Glutamat-Dehydrogenase umgesetzt. Die Meßgröße ist die Abnahme der Absorption von NADH. Die Abnahme verhält sich proportional zur Harnstoff-Konzentration und wird bei 340nm photometrisch bestimmt. Der Test wird am Technicon DAX 72 (Technicon, Fa. Bayer) mit Reagenzien der Firma Bayer durchgeführt. Die Einheit der Meßwerte ist mg/dl.

2.17.4 Bestimmung der Ammonium-Konzentration

Die Bestimmung der Ammonium-Konzentration findet im Zentrallabor der Charité statt. Die angewandte Methode wird von Thomas[99], Seite 213-216 beschrieben und von der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie empfohlen.

Die Bestimmung der Ammonium-Konzentration erfolgt als kinetisch-enzymatischer UV-Test. Ammonium wird mit 2-Oxoglutarat und $NADH_2$ zu Glutamat, NAD und Wasser mittels Glutamat-Dehydrogenase umgesetzt. Die Meßgröße ist die Abnahme der Absorption von

NADH. Die Abnahme verhält sich proportional zur Harnstoff-Konzentration und wird bei 340nm photometrisch bestimmt. Der Test wird am Kodak Ektachem 250 (Fa. Johnson & Johnson) mit Reagenzien der Firma Johnson & Johnson durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Im Rahmen der ersten klinischen Anwendung des oben beschriebenen hybriden Leberunterstützungssystems wurden acht Patienten behandelt. Alle Patienten wurden nach der Behandlung transplantiert und konnten aus dem Krankenhaus entlassen werden. Ziel dieser klinischen Studie war es, Informationen über die Verträglichkeit und Wirksamkeit des Systems zu erlangen. Alle Patienten befanden sich im akuten Leberversagen und waren für eine Lebertransplantation gelistet. Es sollten Informationen über die biochemische Funktion der zur Therapie verwendeten Zellkulturen gesammelt werden. Tabelle 11 gibt allgemeine Informationen zu den behandelten Patienten. Tabelle 12 gibt Auskunft über die zur Anwendung gekommenen Bioreaktoren. Bei dem ersten behandelten Patienten kamen zwei unterschiedliche Bioreaktoren zum Einsatz. Beginnend mit der Behandlung des zweiten Patienten wurde ein System der Probenentnahme und Datenerhebung entwickelt, das Bilanzierungen für den Stoffwechsel der eingesetzten Bioreaktoren erlaubt. Die Datenerhebung bei Behandlung des ersten Patienten war ungenügend. Die Probenentnahme in Bioreaktoren und Patient erfolgte nicht gleichzeitig; Wechsel zwischen den eingesetzten Bioreaktoren und häufige Therapieunterbrechungen lassen eine Bilanzierung nicht sinnvoll erscheinen. Die zur Behandlung des ersten Patienten eingesetzten Bioreaktoren werden bei nachfolgenden Bilanzierungen nicht berücksichtigt. Die Behandlung des ersten Patienten diente unter anderem der Entwicklung einer geeigneten Datenerhebung. Die klinische Anwendung des Systems erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission, der Senatsstelle für Gesundheit und des Landesamtes für Arbeitsschutz und technische Sicherheit. Die Behandlung erfolgte mit dem Einverständnis der gesetzlichen Vertreter der Patienten.

Tabelle 11: Allgemeine Patientendaten

	Alter	**Geschl.**	**Ätiologie des ALV**	**Klassifik. ALV**	**Behandlugsende**
Patient 1	45	f	medikamenteninduziert	akut	LTx
Patient 2	20	f	unbekannt	akut	LTx
Patient 3	58	f	medikamenteninduziert	subakut	LTx
Patient 4	31	f	unbekannt	hyperakut	LTx
Patient 5	27	f	unbekannt	akut	LTx
Patient 6	32	m	Hepatitis B	akut nach chronisch	LTx
Patient 7	33	f	Hepatitis B	akut	LTx
Patient 8	49	f	Hepatitis B	akut	LTx

Tabelle 12: Bioreaktordaten

	Therapie-dauer [h]	**Masse des Spendertieres [kg]**	**Masse der Zellkultur [g]**	**mittlerer Filtratfluß [ml/min]**	**Alter der Zellkultur [d]**
Bioreaktor 1 a2	7	23	235	36	14
Bioreaktor 1 b	22	18	193	52	7
Bioreaktor 2	24	12	193	37	8
Bioreaktor 3	18	14	257	40	0,3
Bioreaktor 4	29	15	214	19	0,25
Bioreaktor 5	38	19	428	33	2
Bioreaktor 6	38	16	353	24	2
Bioreaktor 7	19,5	19	375	29	12
Bioreaktor 8	6,5	18	171	32	1
Mittelwert	**22**	**17**	**267**	**34**	**5,2**

[2] Bei der Behandlung des ersten Patienten kamen zwei verschiedene Bioreaktoren zum Einsatz.

3.1 Ammoniumstoffwechsel

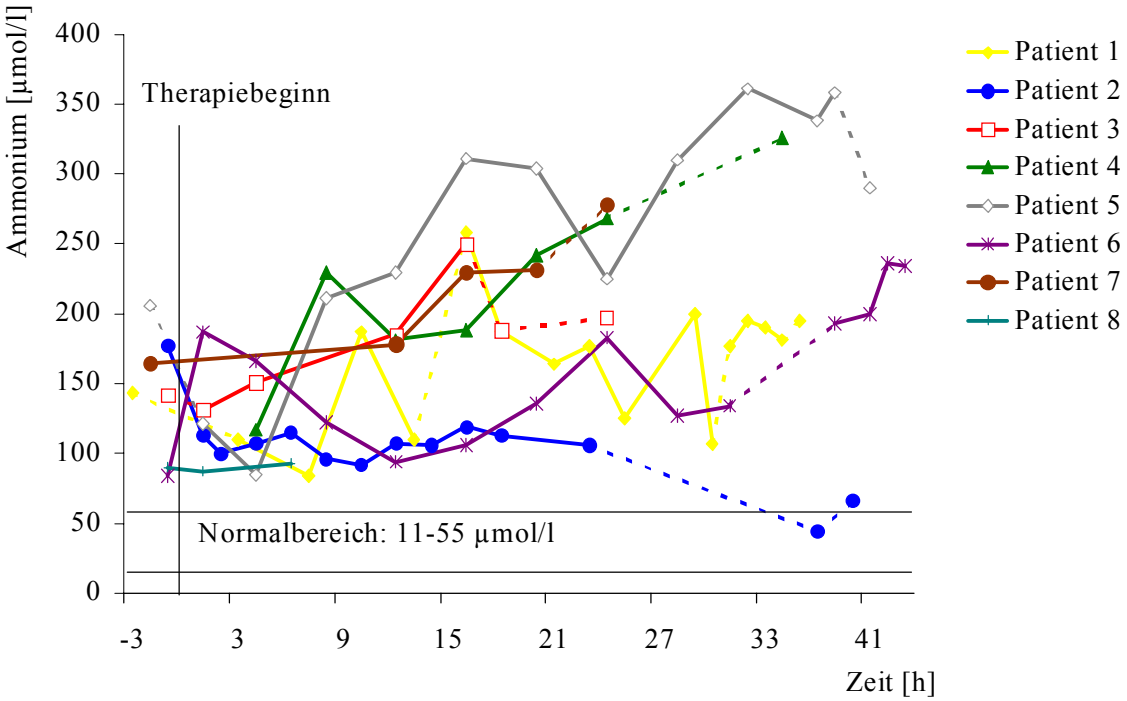

Abb. 5: Ammoniumspiegel der Patienten während der Therapie; gestrichelte Linie: Therapieende bzw. –unterbrechung; Therapiebeginn bei Zeitpunkt 0.

Abb. 5 zeigt den Verlauf der Ammoniumspiegel während der Therapie und wenige Stunden nach Beendigung der Therapie (gestrichelte Linie: nach Beendigung der Therapie bzw. Therapieunterbrechung). Aus der Abbildung geht hervor, daß alle Patienten einen erhöhten, deutlich über dem Normalbereich liegenden Ammoniumspiegel aufweisen. Ein Absinken des Spiegels im Verlauf der Therapie ist lediglich bei Patient 2 zu verzeichnen, der im Anschluß an die Therapie sogar vorübergehend den Normalbereich erreichte. Relativ konstant blieb der Ammoniumspiegel während der Therapie bei den Patienten 6 und 8. Bei allen übrigen wurde ein weiterer Anstieg der Ammoniumkonzentration im Plasma im Verlauf der Therapie nicht verhindert.

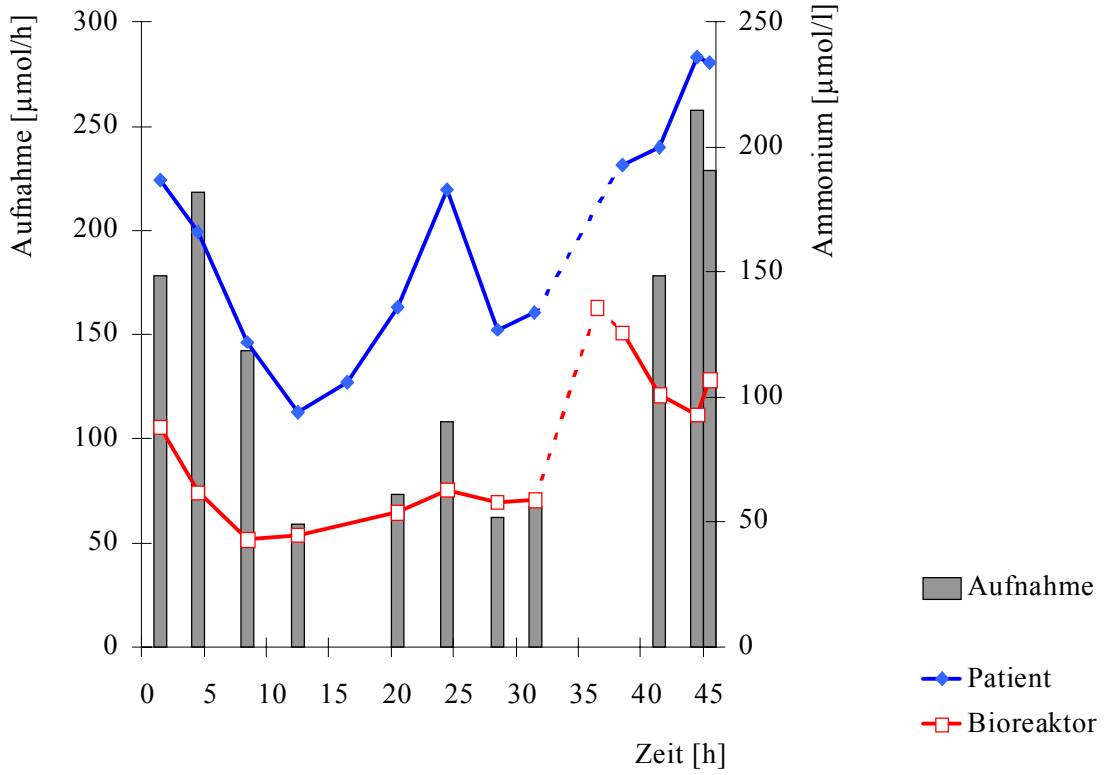

Abb. 6: Ammoniumplasmaspiegel in Patient 6 und Bioreaktor 6; berechnete Ammoniumaufnahme durch den Bioreaktor (graue Balken); gestrichelte Linie: Therapieunterbrechung.

Abb. 6 zeigt den Konzentrationsverlauf von Ammonium im Plasma von Patient 6 entnommen aus einer Kubitalvene (blaue Linie) und nach Durchlaufen des Bioreaktors (rote Linie) während der Therapie (gestrichelte Linie: Therapieunterbrechung). Patient 6 dient einer exemplarischen Verlaufsbetrachtung, weil hier die längste Behandlungsdauer erreicht wurde. Die Linien der Konzentrationsverläufe bewegen sich gleichsinnig, das heißt, die Konzentrationsänderungen des Patienten sind bei guter Durchmischung auch im Bioreaktor nachzuvollziehen. Nach Durchlaufen des Bioreaktors ist der Ammoniumplasmaspiegel auf niedrigerem Niveau. Diese Konzentrationsdifferenz wird durch eine kontinuierliche Stoffwechselleistung des Bioreaktors aufrechterhalten. Das Plasma wurde mit einer Ammoniumkonzentration von 94 bis maximal 236 µmol/l in den Bioreaktor geleitet und mit einer Konzentration von 43 bis 126 µmol dem Patienten zurückgeführt. Während des langen Behandlungsintervalls von Stunde 8 bis 32 wurde der Ammoniumspiegel im Bioreaktor auf physiologische Werte von ca. 50 µmol/l gesenkt. Mit Hilfe der unter 2.16 beschrieben Formel $U = F(C_B - C_P)$ wird die Nettoaufnahme (graue Balken) bezogen auf ein Zeitintervall von einer Stunde berechnet. Die Filtrationsrate bei Patient 6 betrug

zwischen 15 und 35 ml/min, die errechnete Netto-Ammoniumaufnahme zwischen 59 und 257 µmol/h.

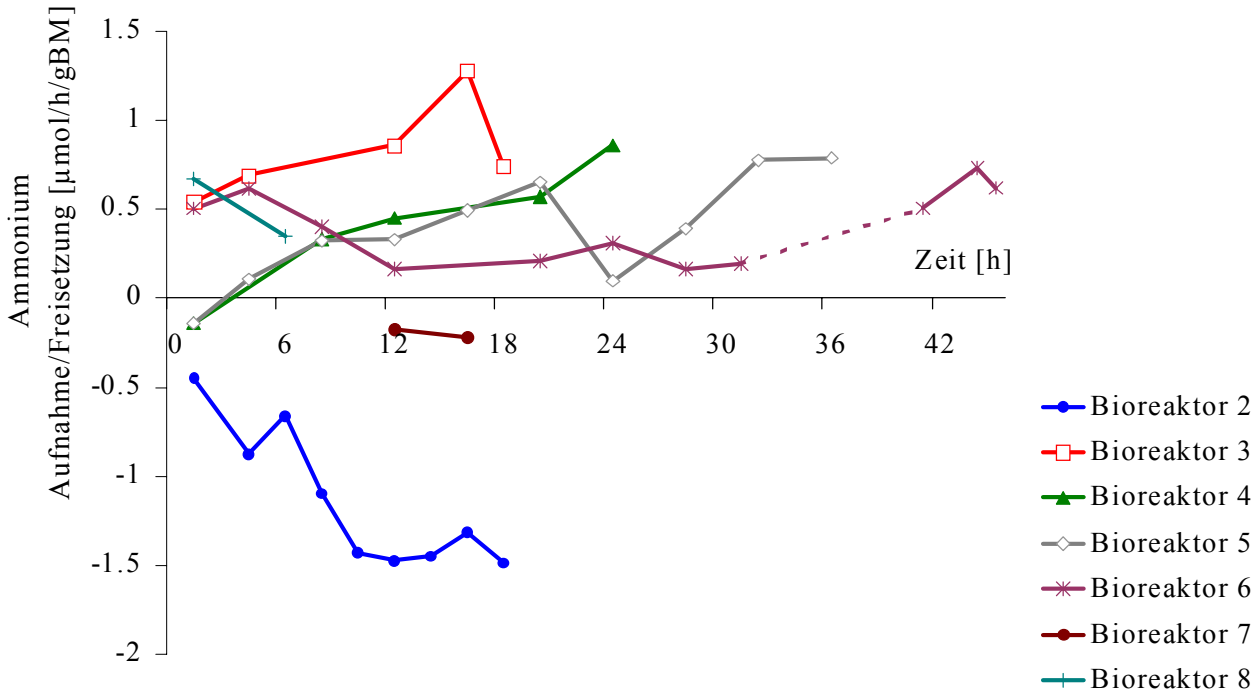

Abb. 7: Ammoniumaufnahme und -freisetzung durch die Bioreaktoren; gestrichelte Linie: Therapieunterbrechung

Die Werte auf Abb. 7 zeigen die Nettoaufnahme (positive Werte) beziehungsweise Freisetzung (negative Werte) der Bioreaktoren von Ammonium pro Stunde und Gramm Zellen. Dazu wurde die Nettobilanz nach der in 2.16 genannten Formel, wie oben ausführlich für Patient 6 beschrieben, berechnet und auf die Zellmasse des Lebergewebes im Bioreaktor bezogen, um Werte mehrerer Bioreaktoren untereinander vergleichbar zu machen. Bei fünf Patienten war der Ammoniumspiegel nach Durchlaufen des Bioreaktors erniedrigt, das heißt, daß eine Ammoniumaufnahme durch die Bioreaktoren stattfand. Bei zwei Patienten war der Ammoniumspiegel nach Durchlaufen des Bioreaktors erhöht, es geschah also eine Nettofreisetzung durch die Bioreaktoren.

3.2 Glutaminstoffwechsel

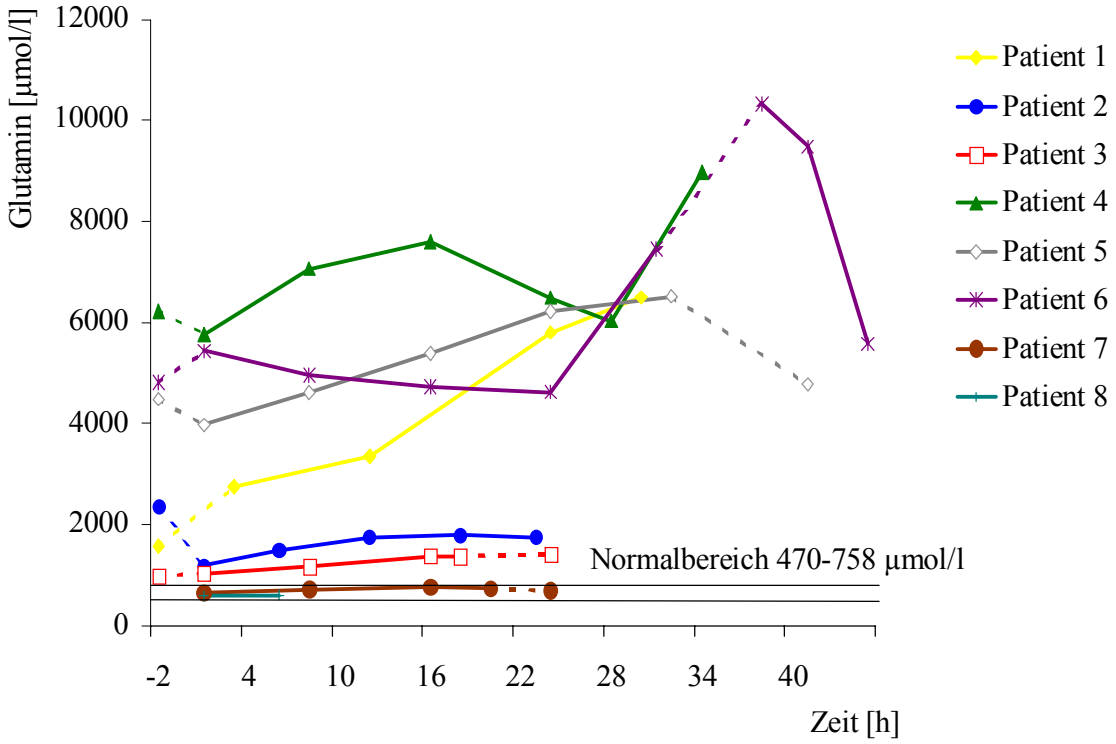

Abb. 8: Verlauf der Glutaminspiegel der Patienten während der Therapie; gestrichelte Linien: Therapieende bzw. -unterbrechung; Therapiebeginn bei Zeitpunkt 0.

Abb. 8 zeigt, daß die Glutaminspiegel der Patienten 7 und 8 im Normalbereich liegen, die Patienten 2 und 3 einen leicht erhöhten Spiegel haben und die Patienten 1, 4, 5 und 6 einen extrem erhöhten Glutaminspiegel über den gesamten Therapieverlauf aufweisen. Glutamin ist Intermediärprodukt im Stickstoffwechsel. In den übrigen Geweben wird Glutamin zur Ammoniumentgiftung aus Glutamat und Ammonium synthetisiert und zur Leber transportiert. Dort ist es Substrat für die Harnstoffsynthese. Wenn die Harnstoffsynthese ausfällt, kann es zum Anstau von Glutamin im Plasma kommen.

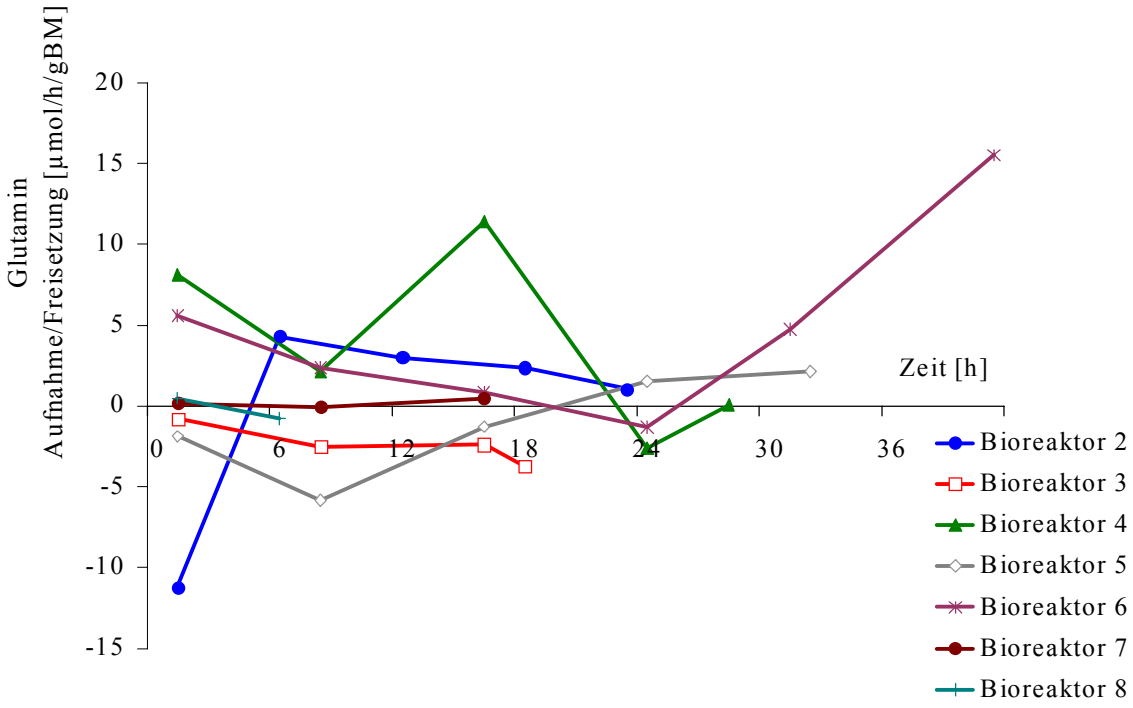

Abb. 9: Glutaminaufnahme/-freisetzung der Bioreaktoren

Die Bioreaktoren zeigen häufiger eine Glutaminaufnahme (positive Werte). Nur Bioreaktor 3 zeigt eine kontinuierliche Glutaminfreisetzung. Der Stickstoff aus Glutamin kann für die Bioreaktoren als Substrat für die Harnstoffsynthese verwendet werden. Anschließend kann über die Glutaminsynthetase aus dem anfallenden Glutamat und freiem Ammonium wieder Glutamin hergestellt werden. Das Freisetzen von Glutamin kann durch gute Funktion der Glutaminsynthetase erklärt werden. Bei Patient 3 geht die Nettosynthese von Glutamin mit den höchsten Werten in der Ammoniumelimination einher.

3.3 Harnstoffwechsel

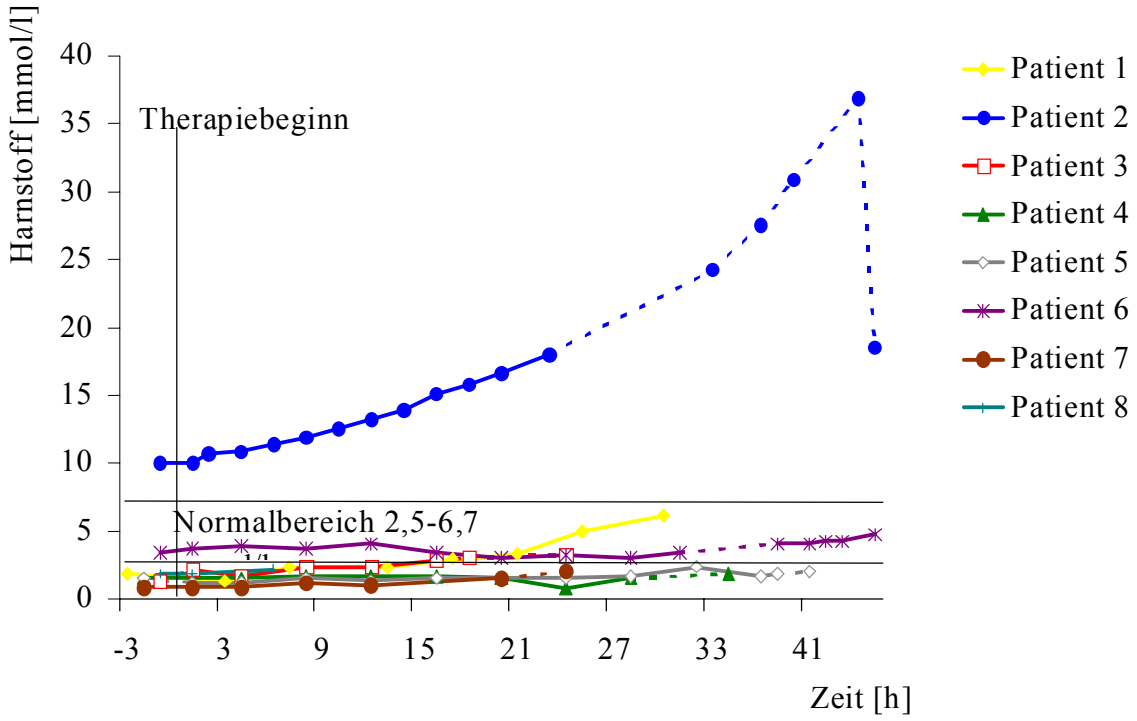

Abb. 10: Verlauf der Harnstoffspiegel aller Patienten während der Therapie; gestrichelte Linien: Therapieende bzw. -unterbrechung; Therapiebeginn bei Zeitpunkt 0.

Bei Patient 2 fällt ein sehr starker Anstieg der Harnstoffkonzentration während der Therapie auf, der auf einsetzendes Nierenversagen zurückzuführen ist. Ein Teil des Harnstoffs, der nicht mehr eliminiert werden konnte, stammte aus dem Bioreaktor. Es wäre aber falsch, die Stoffwechselaktivität des Bioreaktors an diesem Anstieg zu messen. Hier wird deutlich, daß in einem multifaktoriellen Zusammenhang das Gegenüberstellen einzelner Parameter vor und nach der Therapie wenig hilfreich zur Beurteilung der Funktion von LUS ist. Da die Konzentration von Patient 2 stark von der der anderen abweicht, wird die gleiche Tabelle ohne diesen Patienten gezeigt.

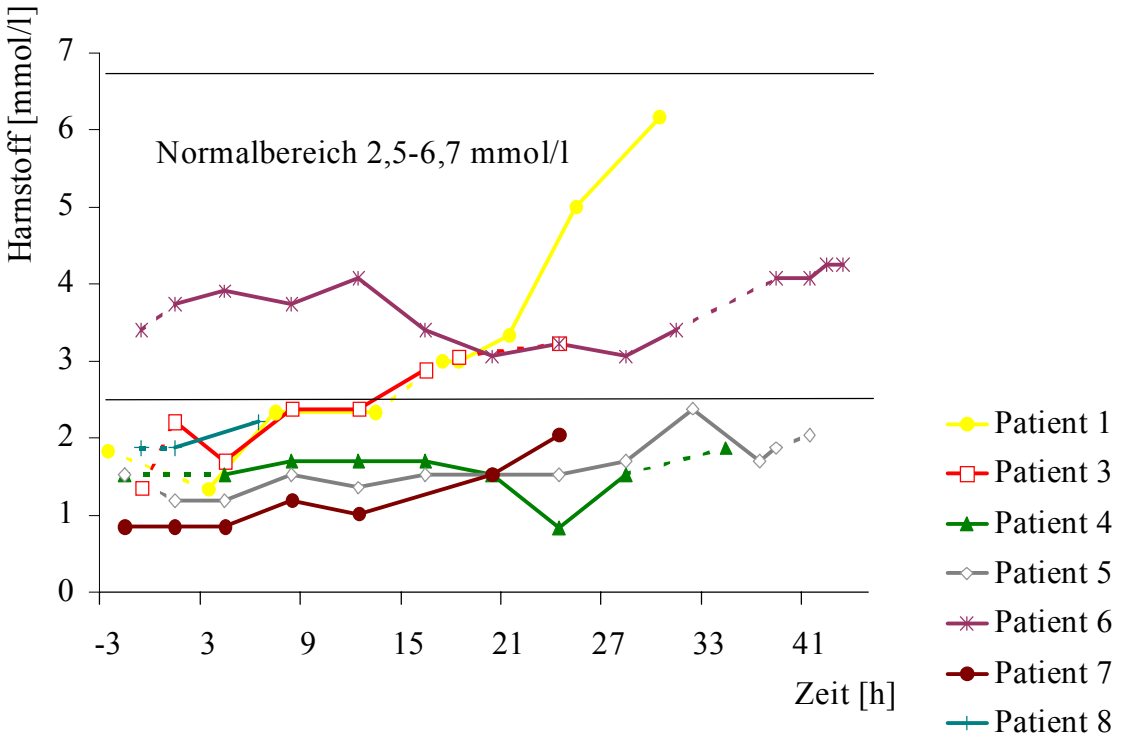

Abb.10 a: Verlauf der Harnstoffspiegel aller Patienten außer Patient 2 während der Therapie; Patient 2 hatte auf Grund einer vorbestehenden renalen Erkrankung hohe Plasmaharnstoffkonzentrationen, so daß durch Weglassen eine übersichtlichere Darstellung der Y-Achse ermöglicht wird. Therapiebeginn bei Zeitpunkt 0; gestrichelte Linie: Therapieende bzw Therapieunterbrechung.

Patienten 1, 3, 7 und 8 verzeichnen einen Anstieg der Harnstoffkonzentration während der Therapie. Bei den übrigen Patienten blieb die Konzentration im Verlauf der Therapie konstant. Alle Patienten außer Patient 6 befinden sich unterhalb des Referenzbereichs, wie es für Patienten im akuten Leberversagen typisch ist. Patient 1 und 3 bewegen sich während der Therapie in den Referenzbereich. Wie alle Stoffe, die im menschlichen Plasma enthalten sind, wurde auch Harnstoff den Patienten durch FFP-Konserven zugeführt (siehe Abb. 16), folglich wurden die erniedrigten Spiegel durch die FFP-Konserven dem Normalbereich angenähert. Weiterhin haben die Patienten durch die Restfunktion der eigenen Leber eine endogene Synthese. Um die Harnstoffkonzentration der Patienten zu bewerten, muß man gleichzeitig die Nierenfunktion betrachten.

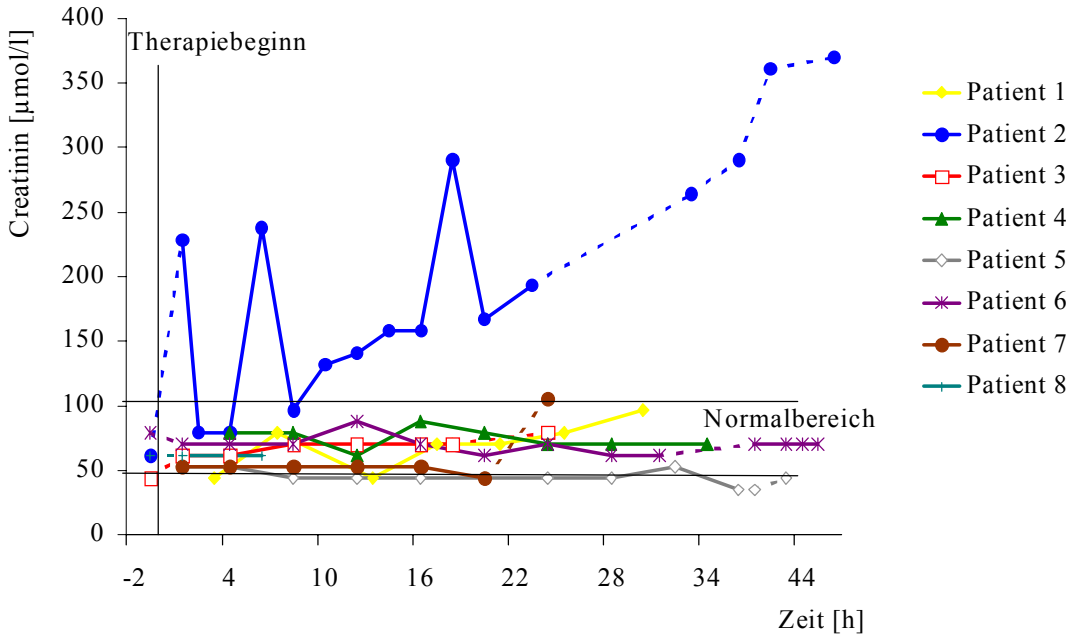

Abb. 11: Creatininspiegel aller Patienten während der Therapie; Therapiebeginn bei Zeitpunkt 0; gestrichelte Linie: Therapieende bzw. -unterbrechung.

Der Verlauf des Creatininspiegels von Patient 2 bestätigt das mit der Therapie einsetzende Nierenversagen und erklärt ausreichend die überschießende Harnstoffkonzentration. Alle übrigen Patienten hatten eine gute Nierenfunktion.

Für den Patienten 6 erfolgt exemplarisch die Darstellung des Konzentrationsverlaufs von Patient, Bioreaktor und Nettofreisetzung in einem Diagramm.

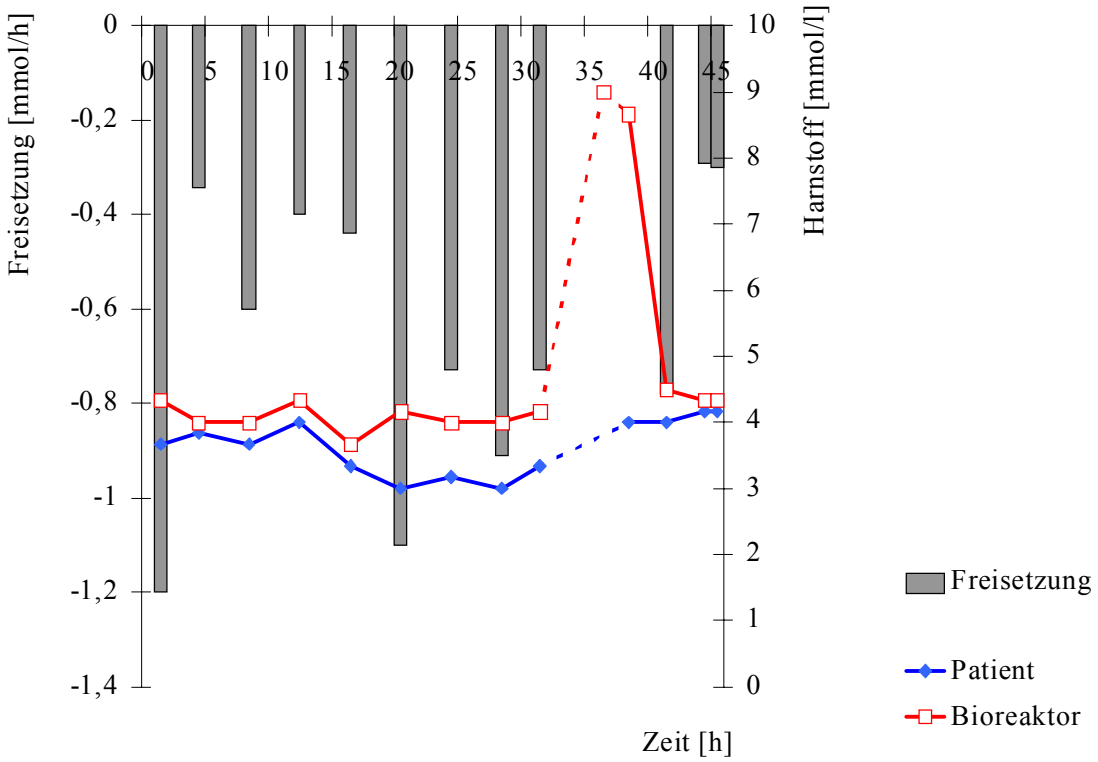

Abb. 12: Harnstoffplasmaspiegel in Patient 6 und Bioreaktor 6; graue Balken: Harnstoffliberation durch den Bioreaktor; gestrichelte Linie: Therapieunterbrechung

Abb. 13 zeigt, daß die Plasma-Harnstoffkonzentration nach Durchfließen des Bioreaktors während der Therapie durchgehend höher war als im Patienten. Daraus wird eine Nettofreisetzung von Harnstoff durch den Bioreaktor abgeleitet. Bei guter Durchmischung während der Therapie gleicht sich die Konzentration im Bioreaktor immer wieder der des Patienten an. Bei einer Unterbrechung der Therapie (gestrichelte Linie) und des Stoffaustausches zwischen Bioreaktor und Patient ist zu erkennen, daß die Harnstoffkonzentration im Bioreaktor bei kontinuierlicher Produktion sofort einem höheren Niveau zustrebt. Der parallele Verlauf der Kurven ist unterbrochen. Bei erneuter Aufnahme der Therapie nähert sich die Konzentrationskurve wieder der des Patienten an, bleibt aber parallel dazu oberhalb verlaufend.

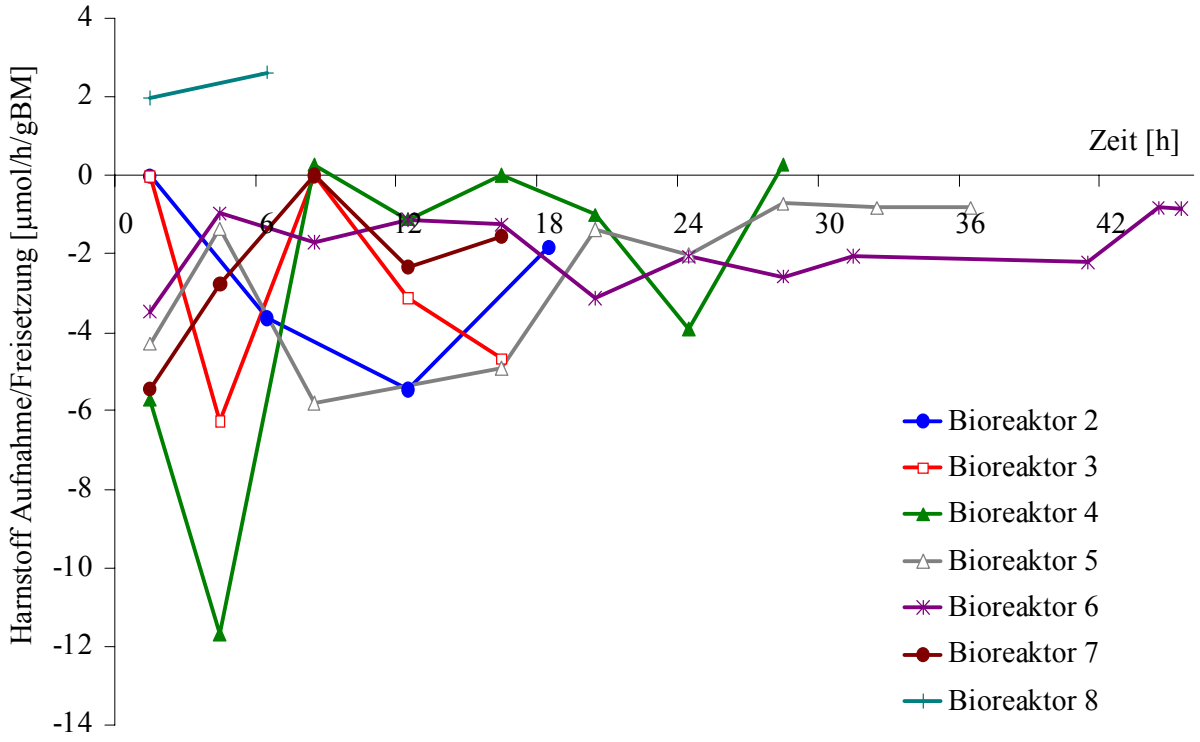

Abb. 13: Harnstoffaufnahme/-freisetzung der Bioreaktoren während der Therapie

Abb. 14 zeigt, daß die Harnstoffkonzentration im Plasma der Patienten 2 bis 7 zu jedem Meßzeitpunkt nach Durchlaufen des Bioreaktors gleich hoch oder höher war, das heißt, daß in dem Bilanzierungsmodell die Harnstoffbilanz der Bioreaktoren negativ war. Ausnahme bildet Patient 8, bei dem nach Durchlaufen des Bioreaktors eine niedrigere Plasma-Harnstoff-Konzentration gemessen wurde. Mögliche Erklärungen hierfür sind eine unzureichende Durchmischung des Systems sowie die mangelnde Zahl von Meßpunkten bei dieser Anwendung. Harnstoff ist ein Indikator für die biochemische Syntheseleistung des Bioreaktors.

3.4 Liberation porcinen Albumins

Porcines Albumin ist ein vom humanen Albumin unterscheidbares Protein, das im Plasma der Patienten aufgrund der Therapie nachweisbar ist. Porcines Albumin ist deswegen ein spezifischer Parameter für die Synthesefunktion des Bioreaktors. Die Bestimmung von porcinem Albumin erfolgte mittels ELISA retrospektiv aus zuvor kryokonservierten Proben in den Tagen und Wochen im Anschluß an die Therapie. Sie dient daher nicht einer Verlaufskontrolle der Behandlung, sondern einer nachträglichen Kontrolle der Syntheseleistung.

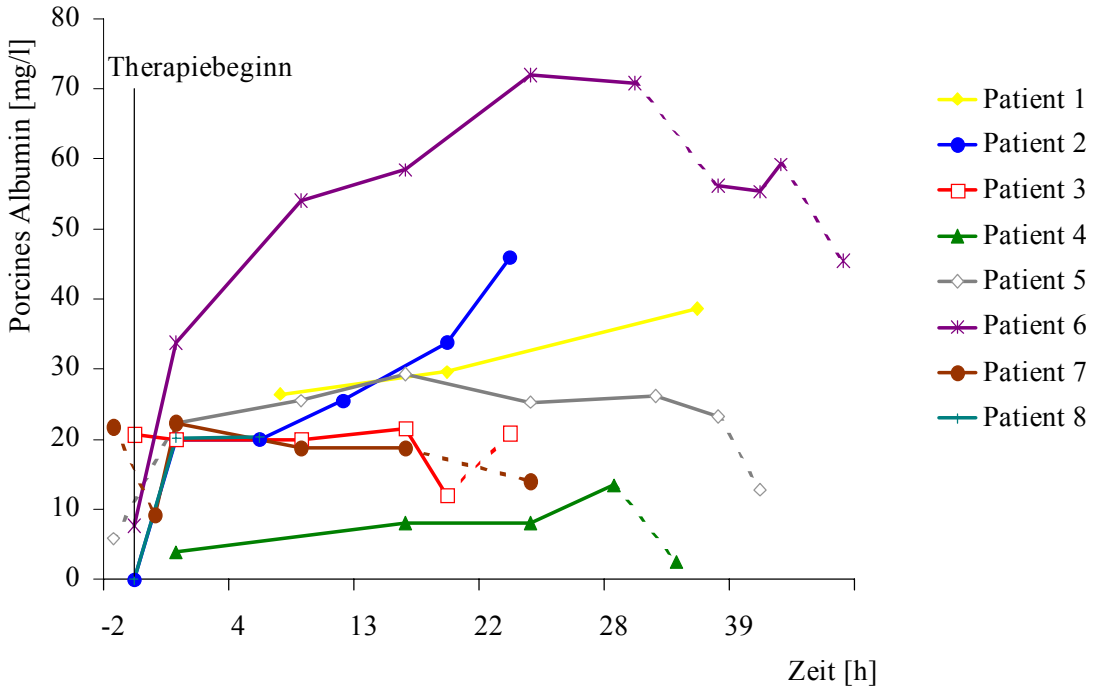

Abb. 14: Schweinealbumin-Plasmakonzentration der Patienten

Abb. 15 zeigt die Schweinealbumin-Konzentration im Patientenplasma im Verlauf der Therapie und im Anschluß (gestrichelte Linie). Ein deutlicher Anstieg der Schweinealbumin-Konzentration im Patientenplasma zu Beginn der Therapie wurde bei den Patienten 1, 2, 5, 6, 8 verzeichnet. Nach Therapieende (bei Patient 6 ebenfalls während der Therapieunterbrechung, gestrichelte Linie) sank die Schweinealbumin-Konzentration bei den Patienten 4, 5, 6, 7 rasch ab. Der höchste Plasmaspiegel von 72 mg/dl und daher die beste Syntheseleistung wurde bei der Behandlung von Patient 6 erzielt. Bei den Patienten 3 und 7 wurden Leerwerte im Bereich von 20 mg/dl vor Therapiebeginn gemessen, die im Verlauf der Therapie nicht wesentlich überschritten wurden. Bei diesen Patienten bleibt also fraglich, ob porcines Albumin synthetisiert wurde. Die mangelnde Validität der Meßmethode wird deutlich. Für die Patienten 1 und 4 liegen keine Werte vor Therapiebeginn vor.

3.5 Glucosestoffwechsel

3.5.1 Glucosespiegel der Patienten

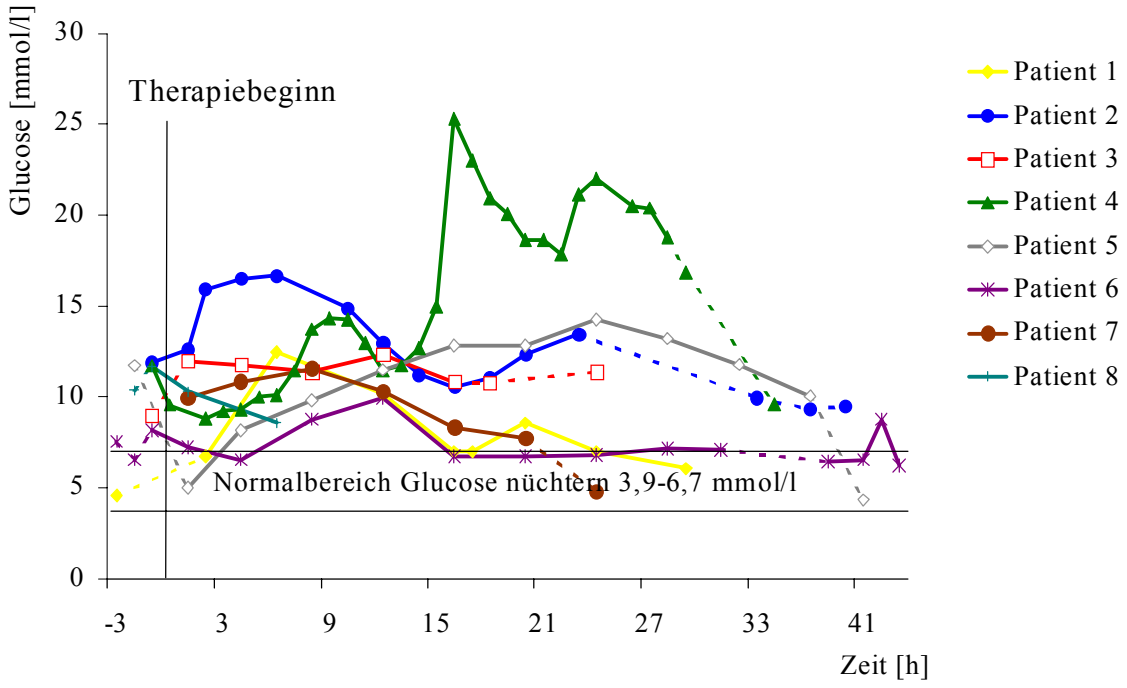

Abb. 15: Glucosespiegel der Patienten während der Therapie; gestrichelte Linie: Therapieende bzw. –unterbrechung; Therapiebeginn bei Zeitpunkt 0.

Abb. 16 zeigt den Glucosespiegel der Patienten im Verlauf der Therapie und einige Stunden im Anschluß an die Therapie (gestrichelte Linie). Auffällig ist, daß alle Patienten, die im akuten Leberversagen dazu neigen, hypoglykämisch zu werden, überkorrigiert wurden und sich in hyperglykämischer Stoffwechsellage befanden. Lediglich Patient 6 konnte, mit Ausnahme des Therapieintervalls von Stunde 8 bis 12, konstant an der oberen Grenze des Referenzbereichs für Glucose gehalten werden. Die meisten Patienten bewegten sich im deutlich hyperglykämischen Bereich der Nierenschwelle von Glucose (ca. 10 bis 11 mmol/l). Die Patienten 2 und 4 erlebten während der Therapie Stoffwechselentgleisungen mit hyperglykämischen Spitzen von über 15 mmol/l bei Patient 2 im Therapieintervall von Stunde 2 bis 10 und bei Patient 4 im Intervall von Stunde 16 bis zum Therapieende bei Stunde 28. Patient 4 erlitt eine Blutzuckerspitze von über 25 mmol/l zu Therapiezeitpunkt 16 Stunden. Die kontinuierliche Glucoseinfusion wurde bei diesem Meßwert für zwei Stunden unterbrochen und im Anschluß von 39 auf 28 mmol/h reduziert, im Zeitintervall von Stunde 21 bis 24 erneut unterbrochen (siehe Tabelle 12). Die Insulinzufuhr

wurde zu diesem Meßzeitpunkt von 5 auf 8 I.U./h erhöht und wurde im weiteren Verlauf der Therapie auf bis zu 20 I.U./h gesteigert. Dem abrupten Absinken des Glucosespiegels wurde wegen der Gefahr der Hirndrucksteigerung immer wieder gegengesteuert, so daß sich eine Wellenbewegung mit hohen Ausschlägen ergab. Trotz aller Maßnahmen ist es nicht gelungen, den Patienten nach diesen Stoffwechselentgleisungen während der Therapie in die Nähe des normoglykämischen Bereichs zu bringen. Erst im Anschluß an die Therapie war ein weiterer Rückgang des Glucosespiegels möglich. Der Glucosespiegel der Patienten wurde im wesentlichen durch die kontinuierliche Glucoseinfusion und gegebenenfalls durch die gleichzeitige Infusion von Insulin gesteuert.

3.5.2 Begleitmedikation mit Einfluß auf den Glucosespiegel des Patienten

Glucoseinfusion

Patienten in akutem Leberversagen haben eine erniedrigte Gluconeogenese, daher benötigen sie Glucoseinfusionen.

Tabelle 13: Glucoseinfusion

	Therapiezeit	**Glucoseinfusion in mmol/h**
Patient 1	Std. 2-15 und 17-34	44
Patient 2	Std. 1-23	78
Patient 3	Std. 1-18	44
Patient 4	Std. 1-10 Std. 11-14 Std. 17-20 und 25-27	22 39 28
Patient 5	Std. 1-36	39
Patient 6	Std. 1-32 Std. 33-45	39 58
Patient 7	Std. 1-20	67
Patient 8	Std. 1-7	67

Die Patienten 2, 4 und 5 erhielten darüber hinaus Insulininfusionen, um den zu stark korrigierten Blutglucosespiegel wieder zu senken, obwohl Patienten in akutem Leberversagen zu einer Hyperinsulinämie neigen, da das Peptidhormon vermindert durch die Leber abgebaut wird.

Tendenziell wurden die Patienten zu stark mit Glucose infundiert und in eine hyperglykämische Stoffwechsellage gebracht (siehe Abb. 16).

Noradrenalin

Die diabetogene Komedikation von Adrenalin und Dopamin bei einzelnen Patienten hatte einen weiterhin erhöhenden Einfluß auf den Glucosespiegel. Die Patienten 5 und 6 erhielten während der Therapie Noradrenalin. Die Patienten 1-4 und 7-8 benötigten keine Katecholamine.

Tabelle 14: Noradrenalingabe bei Patient 5 und 6

Patient	**Dosis [mg]**	**Therapieintervall [h]**
5	0,05	3-27
	0,04	28-31
	0,03	32-33
	0,02	34-36
6	0,2	4-6 und 9-10
	0,1	3 und 7-8 und 11-12
	0,05	13-14

Fresh Frozen Plasma Konserven

Alle Patienten erhielten im Rahmen der Leberunterstützungstherapie, je nach Bedarf, in unregelmäßigen Abständen FFP-Konserven (siehe Abb. 16).

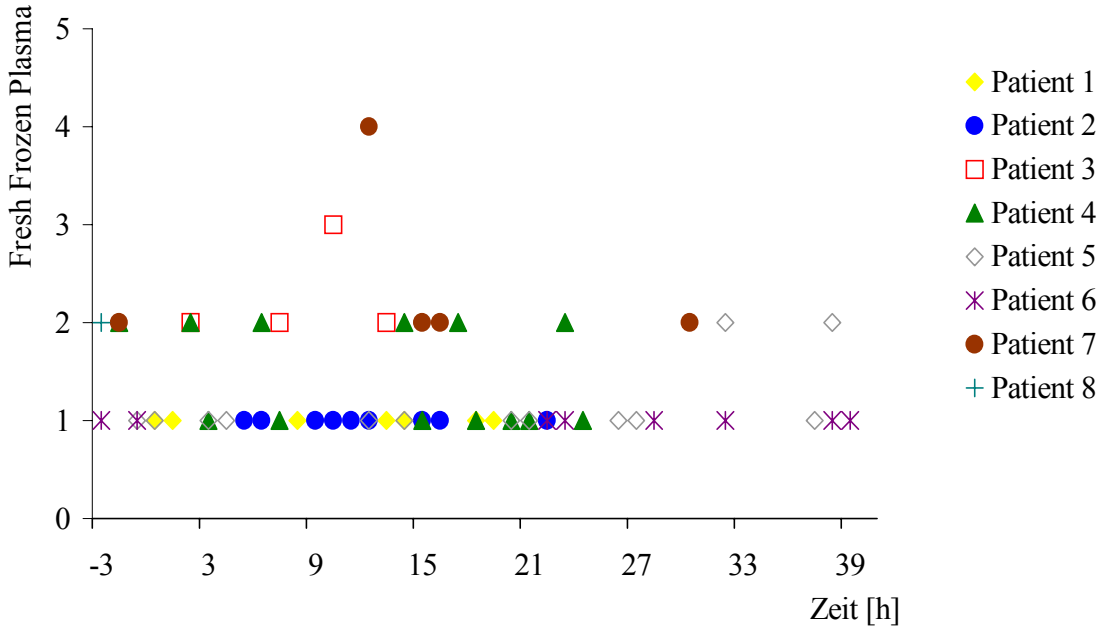

Abb. 16: Fresh Frozen Plasma

Tabelle 15 zeigt die Aufnahme von FFP-Konserven insgesamt.

Tabelle 15: Gabe von FFP-Konserven

	Anzahl von FFP-Konserven
Patient 1	8
Patient 2	9
Patient 3	9
Patient 4	17
Patient 5	13
Patient 6	6
Patient 7	10
Patient 8	0

Eine Konserve enhält ca. 300 ml FFP. Die wiederholte Gabe von FFP-Konserven bewirkte ein Absinken des Glucosespiegels in Richtung Normoglykämie. Entsprechende Verschiebungen in Richtung Normalbereich fanden für alle Stoffe durch die Gabe von FFP-Konserven statt.

3.5.3 Glucosestoffwechsel des Bioreaktors

Die Betrachtung der Nettofreisetzung beziehungsweise Aufnahme von Glucose durch den Bioreaktor dient der Überprüfung der Stoffwechselaktivität des Bioreaktors. Die Glucosekonzentration ist als Parameter schnell verfügbar, reagiert schnell auf Stoffwechselveränderungen und gibt Auskunft über den Energiestoffwechsel des Bioreaktors.

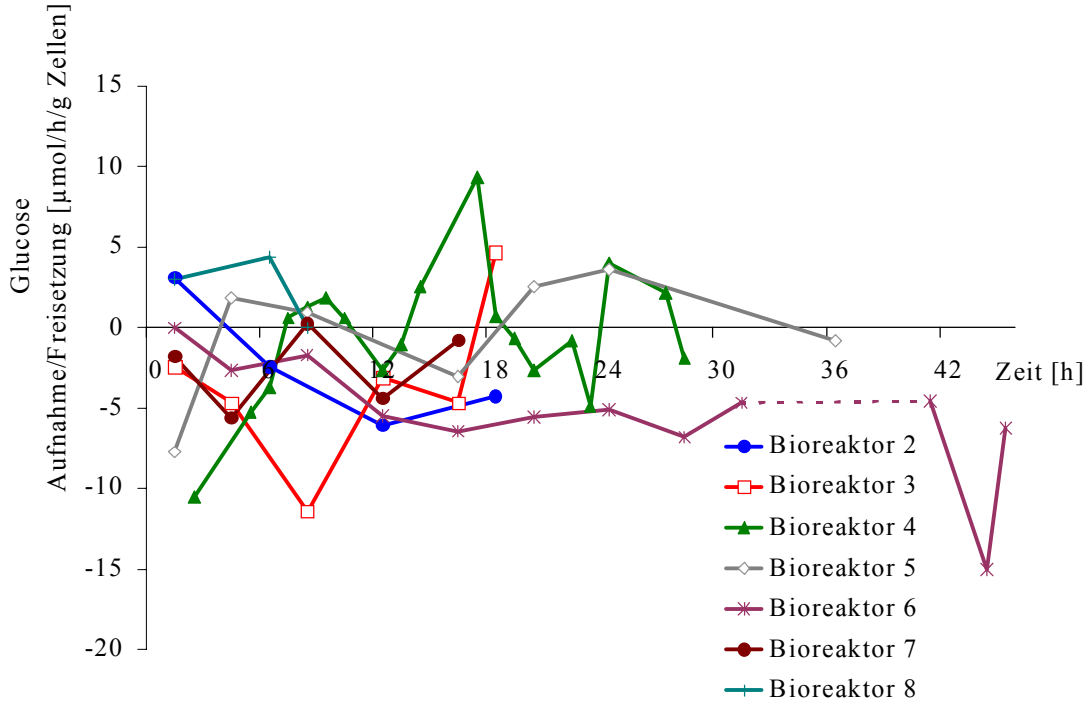

Abb. 17: Glucosefreisetzung/-aufnahme durch die Bioreaktoren während der Therapie

Der Bioreaktor kann sowohl Gluconeogenese leisten als auch Glucose aufnehmen und als Energiesubstrat verwenden. Positive Werte bedeuten, wie bei allen Bilanzierungen, Nettoaufnahme (positive Bilanz) des Bioreaktors, negative Werte Nettofreisetzung (negative Bilanz) des Bioreaktors. Da die Glucoseplasmaspiegel starke Schwankungen während der Therapie durchmachten, können Verzerrungen in der Berechnung der Nettofreisetzung des Bioreaktors (wie in Kapitel 2.16 beschrieben) entstehen. Die Kurven der errechneten Freisetzung bzw. Aufnahme des Bioreaktors zeigen ein uneinheitliches Bild, dennoch war tendenziell eine Nettofreisetzung festzustellen, das heißt, der Glucoseplasmaspiegel war nach Durchlaufen des Bioreaktors höher, als zu gleichem Zeitpunkt am Patienten gemessen. Für mehrere Patienten zeigen die Kurven einen Wechsel von Glucoseaufnahme und -freisetzung. Bei Patient 4 wurden zwei Meßpunkte unmittelbar nach kleinen (ca. einstündigen) Therapieunterbrechungen an den

Zeitpunkten Stunde 3 und 15 nicht bewertet, um eine ausreichende Durchmischung nach Wiederanschluß zu gewährleisten. Die höchste gemessene Glucoseaufnahme der Bioreaktoren von fast 10 µmol/h/g Zellen trifft bei Patient 4 zu Zeitpunkt 17 genau mit der hyperglykämischen Stoffwechselentgleisung des Patienten zusammen. Hohe Glucose- und Insulinspiegel bewirken in Lebergewebe eine anabole Stoffwechsellage, den Aufbau von Glycogen.

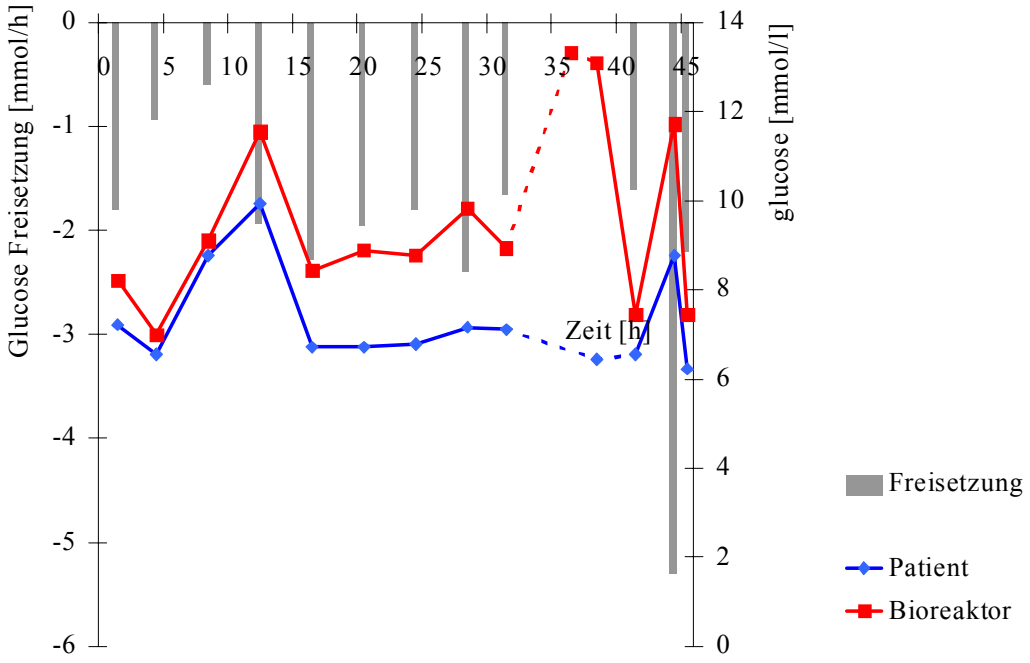

Abb. 18: Glucoseplasmaspiegel von Patient 6 und Bioreaktor 6; graue Balken: berechnete Glucosefreisetzung durch den Bioreaktor; gestrichelte Linie: Therapieunterbrechung

Patient 6 zeigt bei sehr konstantem Glucoseplasmaspiegel des Patienten im Verlauf der (mit 45 Stunden), längsten Therapie eine sehr konstante Glucosefreisetzung des Bioreaktors. Durch die zeitliche Konstanz der Plasmaspiegel sind Verzerrungen durch eine verzögerte Durchmischung ausgeschlossen. Die Daten deuten auf eine gute Stoffwechselleistung des Bioreaktors während der Therapie hin.

3.6 Laktat

Eine Durchsicht der Ergebnisse des Laktatstoffwechsels ergab keinen Hinweis auf eine Beeinflussung des Parameters durch die Bioreaktoren. Die Werte, gemessen in Patient und Bioreaktor, bewegten sich gleichsinnig und zeigten keine wesentlichen Konzentrationsdifferenzen, so daß hier auf eine Bilanzierung verzichtet wurde. Bei einigen Patienten lagen die Werte wechselnd geringfügig höher oder tiefer als im Bioreaktor.

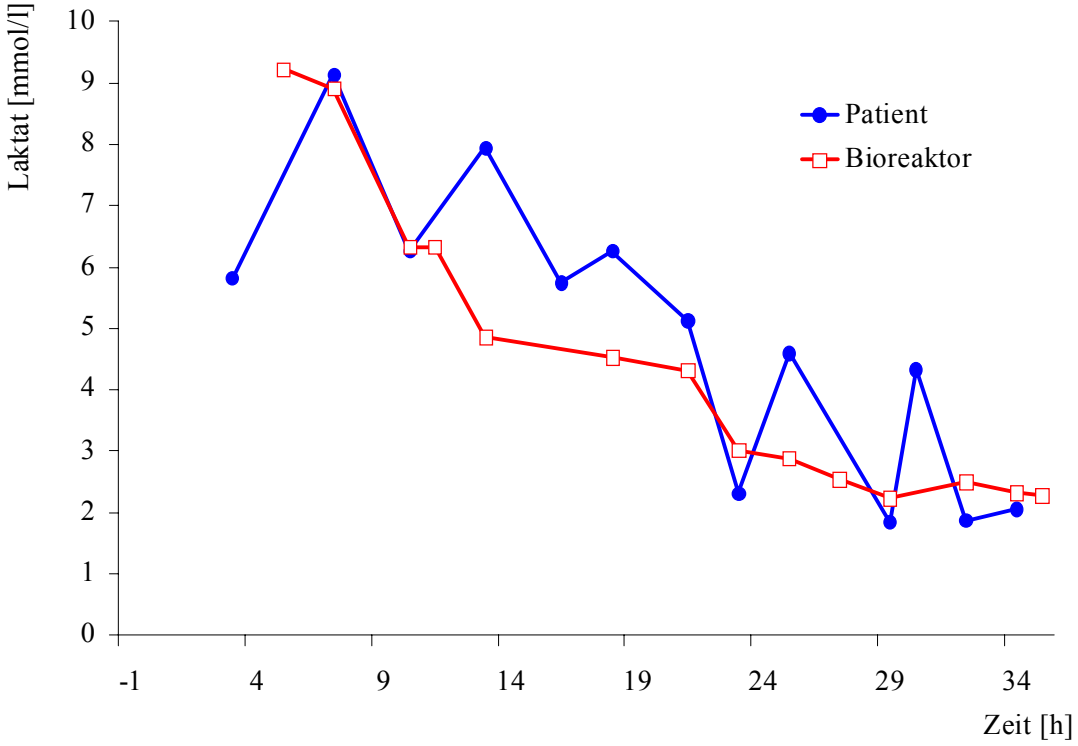

Abb. 19: Laktatplasmaspiegel von Patient 1 und Bioreaktor 1 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

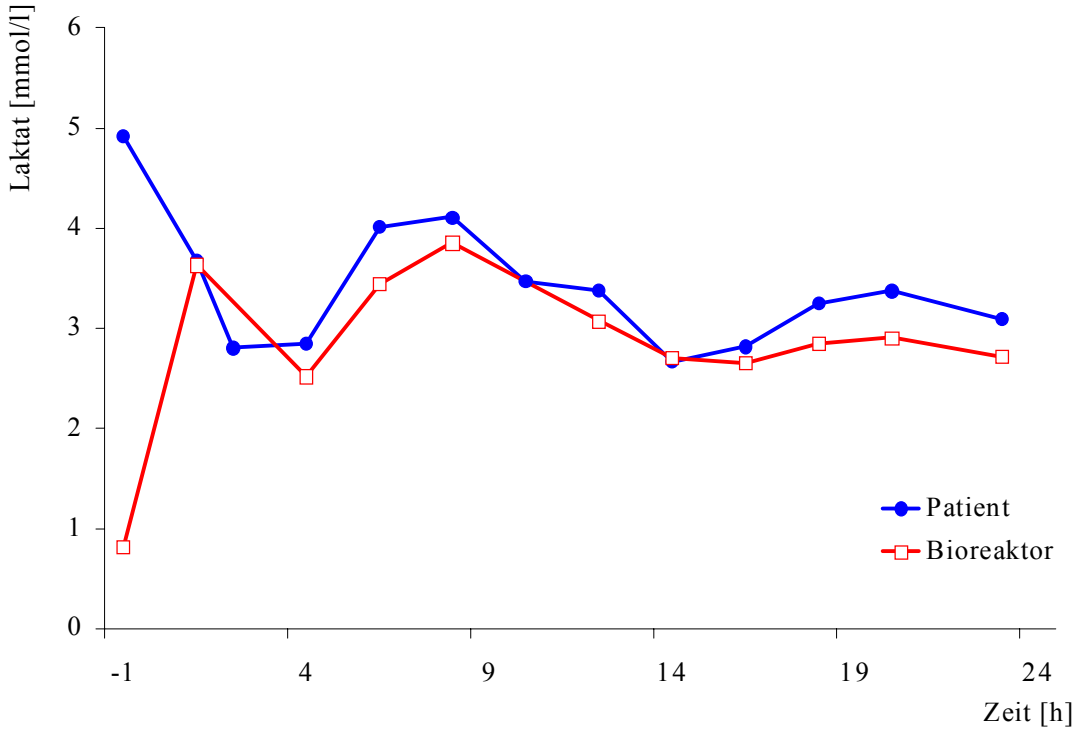

Abb. 20: Laktatplasmaspiegel Patient 2 und Bioreaktor 2 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

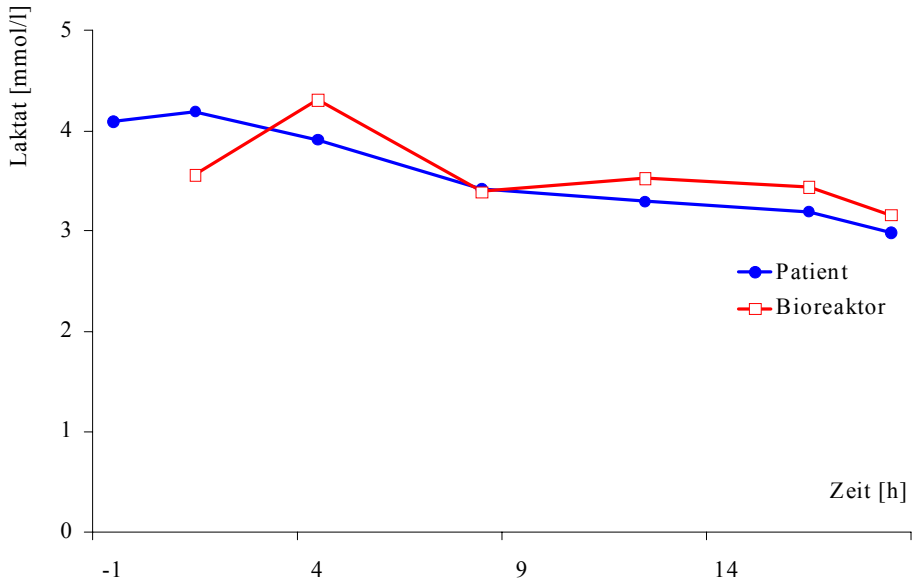

Abb. 21: Laktatplasmaspiegel von Patient 3 und Bioreaktor 3 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

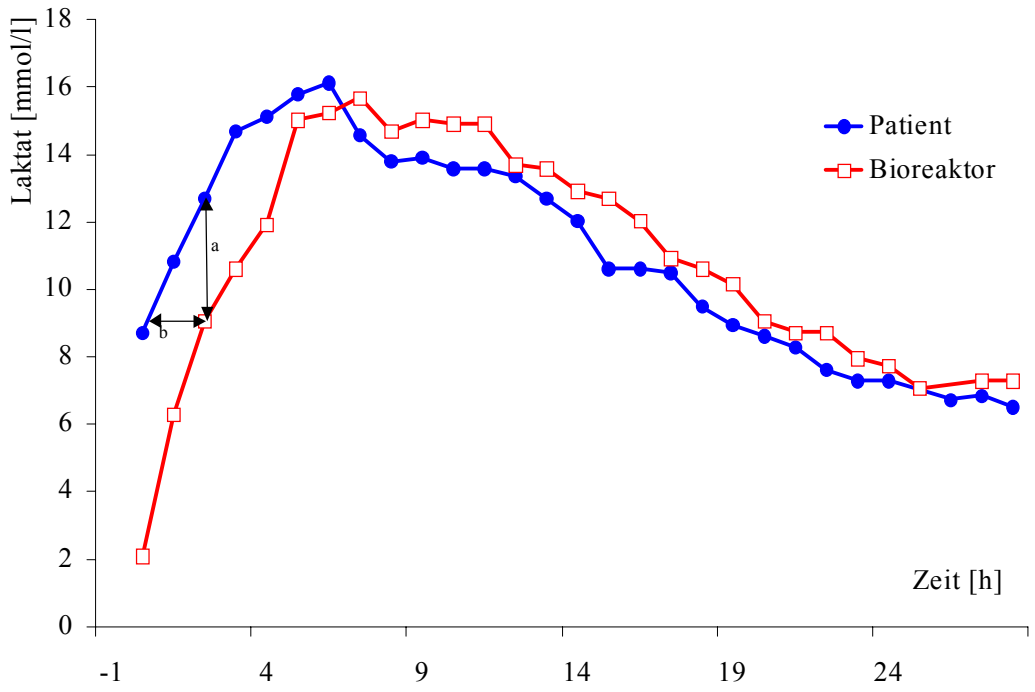

Abb. 22: Laktatplasmaspiegel von Patient 4 und Bioreaktor 4 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)
a = Konzentrationsdifferenz am Zeitpunkt 2 Stunden
b = zeitliche Verzögerung durch Durchmischungsverhältnisse im Bioreaktor von ca. 2 Stunden

Bei Patient 4 sind die Konzentrationsdifferenzen auf ein Artefakt zurückzuführen, hervorgerufen durch verzögerte Durchmischung bei steilen Konzentrationsänderungen; daher möchte ich an dieser Stelle einige Beobachtungen zur Durchmischung des Systems anstellen. Man beachte, daß der Anstieg der Laktatkonzentration in den ersten 5 Stunden der Behandlung im Bioreaktor ca. 800% beträgt. Die Skalierung der Ordinate ist anders gewählt als bei den anderen Patienten, so daß die Steilheit optisch nur zum Teil zur Geltung kommt. Wenn man bei diesem Konzentrationsverlauf den Bioreaktor mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Stunden aufträgt, sieht man, daß keine wesentlichen Konzentrationsdifferenzen bestehen.

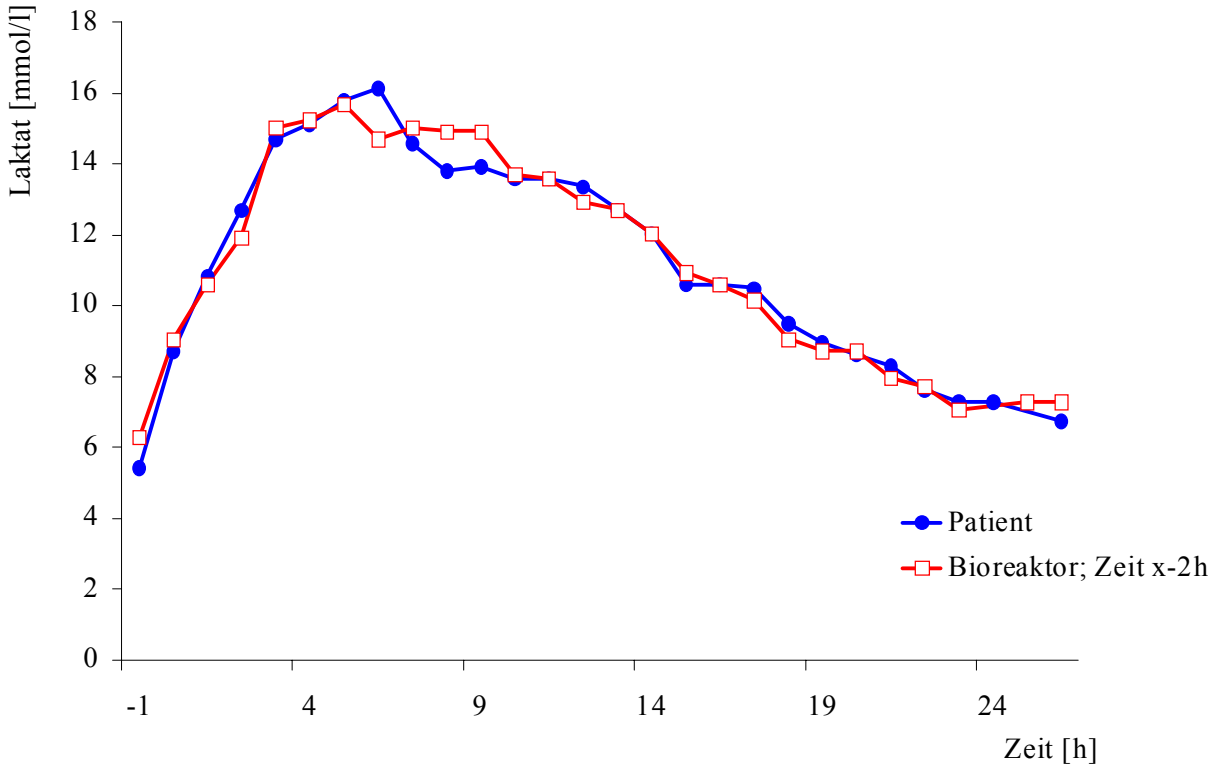

Abb. 23: Laktatspiegel Bioreaktor um 2 Std. verzögert und Patient 4 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

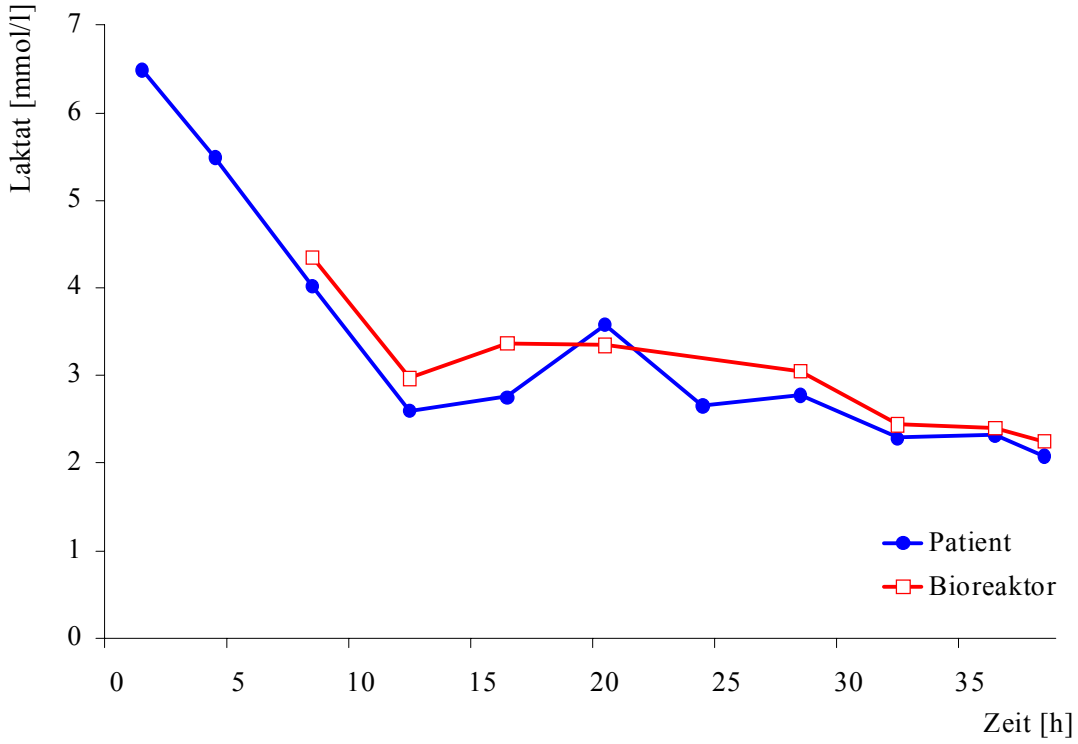

Abb. 24: Laktatplasmaspiegel Patient 5 und Bioreaktor 5 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

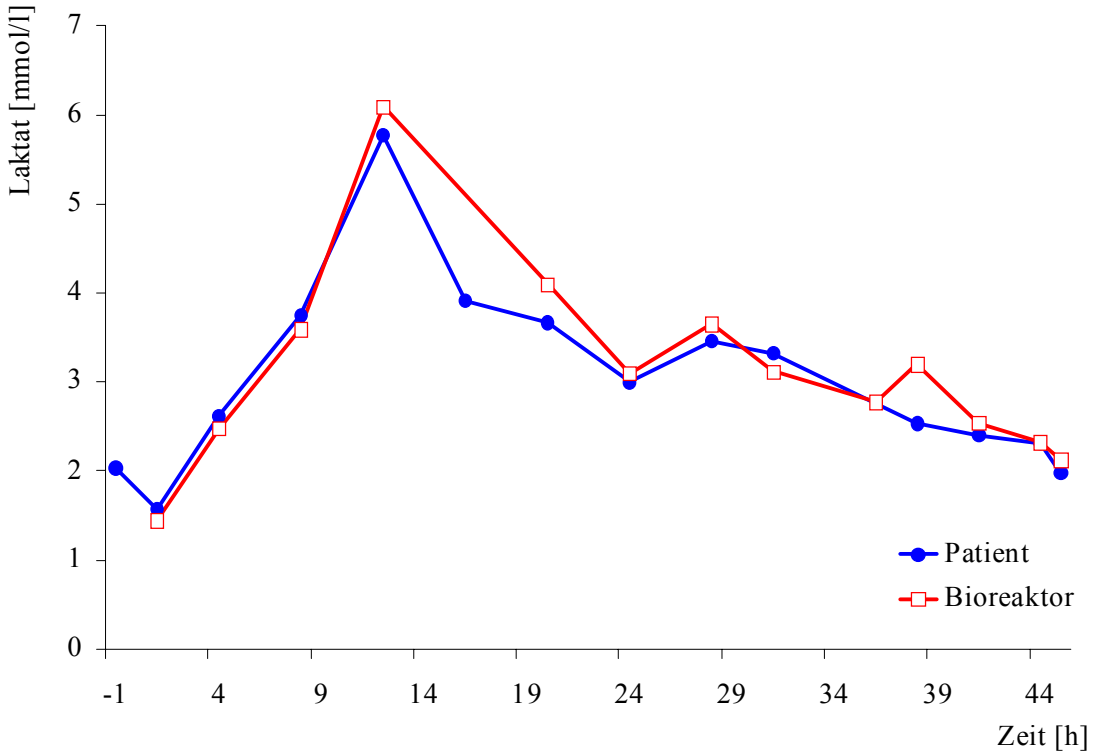

Abb. 25: Laktatplasmaspiegel Patient 6 und Bioreaktor 6 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

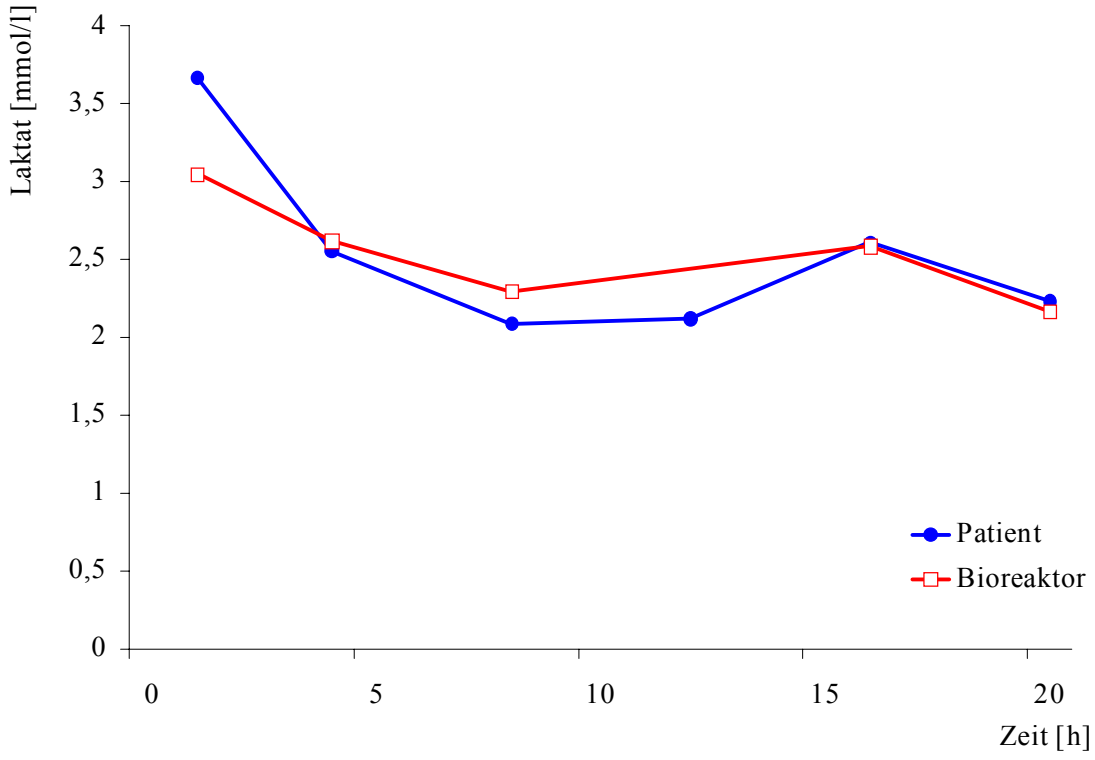

Abb. 26: Laktatplasmaspiegel von Patient 7 und Bioreaktor 7 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

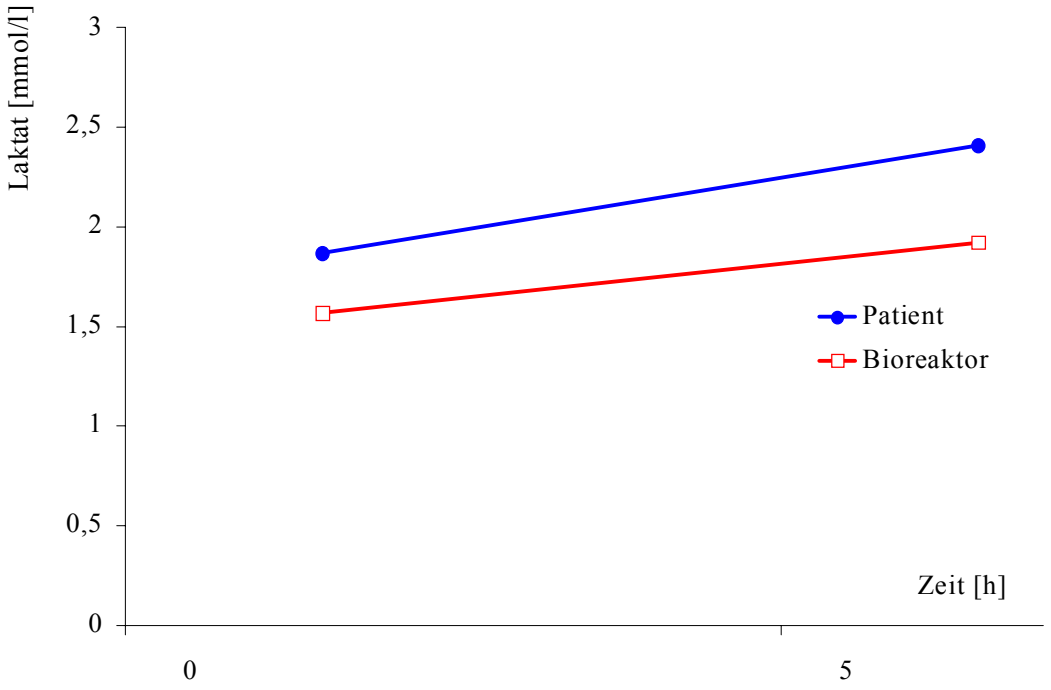

Abb. 27: Laktatplasmaspiegel Patient 8 und Bioreaktor 8 (Normalbereich 0,63-2,44 mmol/l)

4 DISKUSSION

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Definition von Parametern zur Beurteilung der Leberfunktion von hybriden Leberunterstützungssystemen unter der Anwendung. Ein Urteil über die Stoffwechselaktivität von Bioreaktoren muß sich aus der Interpretation mehrerer biochemischer Parameter ergeben. Jeder biochemische Parameter unterliegt Störgrößen, die seine Aussagekraft limitieren. Folgende Aufzählungsliste soll einen Überblick über die behandelten Parameter geben.

- Ammonium: Eine direkte ursächliche Verknüpfung mit dem Krankheitsbild der Enzephalopathie begründet eine genaue Beobachtung der Stoffwechselbeeinflußung durch den Bioreaktor. Die Meßgenauigkeit wird vom Labor als etwas niedriger angegeben als für die häufig untersuchten Standardparameter, ist dennoch ausreichend bei raschem, eisgekühltem Transport. Die Testergebnisse sind innerhalb von einer Stunde verfügbar.
- Harnstoff: ebenfalls hohe Relevanz für die Ausbildung von Symptomen; hohe Meßgenauigkeit; geringer Aufwand; Verfügbarkeit innerhalb einer Stunde; Nachteil: starke Schwankungen der Patientenplasmaspiegel bei Nachlassen der Nierenfunktion.
- Glutamin: Relevanz für die Ausbildung von Symptomen; Spezialuntersuchung: höherer Aufwand, geringere Meßgenauigkeit; Verfügbarkeit: nach der Therapie, keine Verlaufskontrolle möglich.
- Porcines Albumin: hochspezifischer Parameter für die Funktion der Bioreaktoren, geringer Einfluß von Störgrößen; Spezialuntersuchung mit geringer Meßgenauigkeit, hohem Aufwand; Nachteil: Verfügbarkeit nach der Therapie, keine Verlaufskontrolle möglich; keine Relevanz für die Ausprägung von Symptomen; als Makromolekül vermehrtes Zurückhalten durch langsam verstopfende Plasmafilter bei abnehmender Filterqualität.
- Glucose: Verfügbarkeit: sofort; Aufwand: gering; Meßgenauigkeit: hoch; Nachteil: starke Beeinflußung durch Störgrößen, Medikamente, Glucoseinfusion; stark schwankende Plasmaspiegel; keine Relevanz für die Ausprägung von Symptomen.
- Laktat: Vefügbarkeit innerhalb einer Stunde; geringe Relevanz für die Ausprägung von Symptomen. Nachteil: stark schwankende Patientenplasmaspiegel, keine spezifischer Test der Leberfunktion.

Auf eine Darstellung spezifischer Leberenzyme wie ALT und AST, sowie der weniger spezifischen LDH und GLDH wurde aus folgenden Gründen verzichtet, obwohl die Bestimmung in-vitro als Marker für die Zellqualität herangezogen wird: Die indirekte Bestimmung, die den

Enzymumsatz mißt, unterscheidet nicht zwischen menschlichen und porcinen Enzymen. Die stark erhöhten Plasmaspiegel der Patienten erschweren eine Bilanz. Die Meßgenauigkeit würde hier nicht ausreichen, um Unterschiede, eventuell eine weitere Erhöhung der Plasmaspiegel durch die Bioreaktoren, festzustellen. Die relativ großen Moleküle sind in starkem Maß von der Durchlässigkeit der Plasmafilter und Membranen abhängig. Nach Erneuerung des Filters ist die Passage gut, verringert sich dann mit zunehmend verstopfenden Poren.

Nachfolgend soll diese Bewertung für die einzelnen Parameter ausführlich diskutiert werden.

4.1 Ammoniumstoffwechsel

Positiv zu bewerten ist der detoxifizierende Effekt der Bioreaktoren auf den Ammoniumstoffwechsel bei 5 der 7 ausgewerteten Patientenbehandlungen. Wir können davon ausgehen, daß der Ammoniumspiegel dieser Patienten ohne die Behandlung mit dem Bioreaktor noch stärker angestiegen wäre (siehe Abb. 7). Bei zwei Patienten, 2 und 7, war das Gegenteil der Fall. Die Bioreaktoren bewirkten eine weitere Erhöhung des Plasmaspiegels. Wenn wir uns an Abb. 5 erinnern, hatte Patient 2 ohnehin einen der Norm nahen, im Absinken begriffenen Plasmaspiegel, jedoch können wir dieses Absinken ausdrücklich nicht dem Bioreaktor zuschreiben (vgl. Abb. 7).

Für eine Ammoniumfreisetzung, die durch die Bioreaktoren bei den Patienten 2 und 7 geschah, kommen verschiedene Erklärungen in Frage. Starker Zellzerfall mit ausgedehnten nekrotischen Gebieten im Reaktorinnern, wie sie auf licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Gewebes nach Behandlung zu sehen sind, kann ein Freisetzen von Zelltrümmern und Proteinen bewirken. Durch den Abbau freiwerdender Aminosäuren kann zusätzlich Ammonium entstehen.

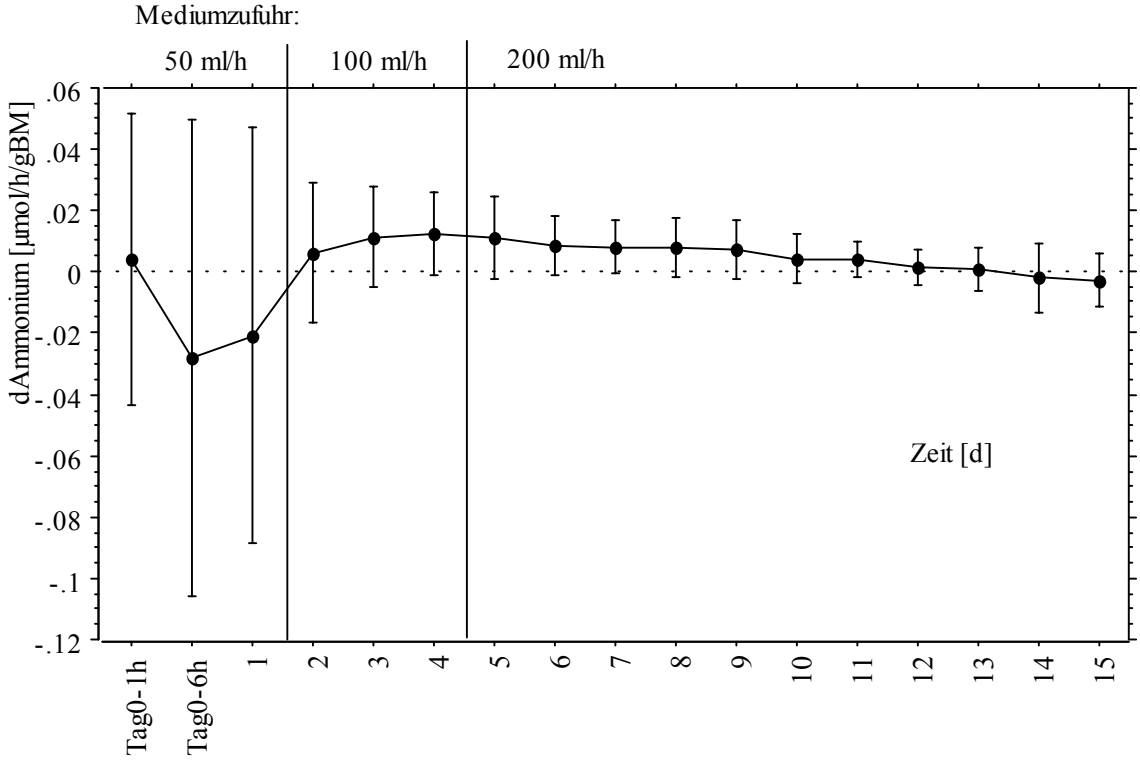

Abb. 28: Ammoniumbilanz von 14 Bioreaktoren aus dem Zellkulturbetrieb

Abb. 28 stellt die Ammoniumbilanz von 14 Bioreaktoren im Zellkulturbetrieb (vor Therapie) dar (negative Werte = Freisetzung, positive Werte = Aufnahme). Es wird deutlich, daß die Bioreaktoren in der Anfangsphase der Zellkultur, unmittelbar nach initialer Zellschädigung durch die Zellisolierung, und wieder nach einer Kulturdauer von mehr als 12 Tagen Ammonium freisetzen. In der Zwischenzeit überwiegt eine Nettoaufnahme, die das Optimum einer therapeutischen Nutzung darstellt. Die Werte in der Anfangsphase sind sehr stark gestreut. Bei den Bioreaktoren, die für die Therapie verwendet wurden, fällt auf, daß eine Ammoniumfreisetzung bei den Patienten 2 und 7 durch die mit Abstand ältesten Zellkulturen geschah (siehe Tabelle 11). Patient 2 wurde mit einer Zellkultur behandelt, die 8 Tage alt war, Patient 7 mit einer Zellkultur, die 12 Tage alt war. Daher ist meine Empfehlung, bis zu einer weiteren Verbesserung der Kulturbedingungen Zellkulturen, die nicht älter als eine Woche sind, zu verwenden, um einer weiteren Belastung der Patienten mit Ammonium vorzubeugen.

Eine biochemische Erklärung für die Ammoniumfreisetzung ist eine gesteigerte Glutaminasereaktion der Hepatozytenkultur bei hoher Glutaminbelastung. Wenn der aus der Glutaminasereaktion frei werdende Ammonium die Harnstoffsynthesekapazität der Hepatozyten

übersteigt, resultiert eine Nettofreisetzung von Ammonium durch den Bioreaktor. Ein weiteres Problem der Bioreaktoren ist die komplexe räumliche und funktionelle Anordnung der Hepatozyten, die unter Kulturbedingungen nicht erreicht werden kann.[100] Periportale Zellen enthalten ein System zur Harnstoffbildung mit hoher Kapazität zur Ammoniumentgiftung. Das System wird vorwiegend aus der Glutaminasereaktion gespeist, während perivenöse Zellen ein System zur Glutaminsynthese enthalten, das mit hoher Affinität zum freien Ammonium arbeitet.[26] Diese Zonierung ist nach der enzymatischen Zellisolierung aufgehoben. Eine mögliche Erklärung für die Ammoniumfreisetzung ist eine Schädigung der Glutaminsynthetase, denn bei beiden Patienten war eine Harnstoffliberation zu messen.

4.2 Glutaminstoffwechsel

Abb. 9 zeigt weder ein einheitliches Bild der Bioreaktoren untereinander noch eine Konstanz einzelner Bioreaktoren. In allen Bioreaktoren kann der Stickstoff aus dem Glutamin zur Harnstoffsynthese verwendet werden. Nicht alle Bioreaktoren scheinen über das Enzym Glutaminsynthetase zu verfügen, das in Zellkulturen häufig einer Schädigung unterworfen ist.[101] Lediglich bei den Patienten 3 und 5 ist über eine gewisse Konstanz von mehreren Meßpunkten eine Glutaminfreisetzung zu verzeichnen. Daraus ist zu folgern, daß die Glutaminsynthetasekapazität die der für die Harnstoffsynthese benötigten Glutaminasereaktion übersteigt. Daher ist die Nettoammoniumentgiftung dieser Bioreaktoren besonders hoch. Darüber hinaus hatten alle Bioreaktoren eine negative Glutamatbilanz, so daß in den anderen Geweben zusätzlich toxisches Ammonium über die Glutaminsynthetase gebunden werden kann. Um eine komplette Bilanz des Stickstoffwechsels zu erreichen, müssen die Bilanzen aller Aminosäuren analysiert werden. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist eine Analyse der Fisher-Ratio, die das Verhältnis der verzweigtkettigen AS Isoleucin, Leucin und Valin zu den aromatischen AS Phenylalanin und Tyrosin widerspiegelt. Physiologischerweise benutzt die Leber bevorzugt die aromatischen, potentiell neurotoxischen AS zur Energiegewinnung und stellt verzweigtkettige AS für andere Gewebe bereit. Eine Analyse aller AS-Bilanzen übersteigt den Umfang dieser Arbeit.

4.3 Harnstoffwechsel

Nach vorliegenden Ergebnissen zu urteilen, ist Harnstoff der geeignetste Parameter für eine Verlaufskontrolle im Sinne der Fragestellung. Bei einer negativen Harnstoffbilanz des Bioreaktors ist von einer guten Stoffwechselfunktion auszugehen. Wenn die Harnstoffbilanz des Bioreaktors jedoch über mehrere Meßzeitpunkte positiv bleibt, wie es bei Patient 8 der Fall war, kann man den Verdacht auf mangelnde Stoffwechselfunktion des Bioreaktors aussprechen.

Um die Ergebnisse besser bewerten zu können, ist ein Vergleich der Stoffwechselleistung der Bioreaktoren, die zur Therapie benutzt wurden, mit denen, die ausschließlich im Zellkulturbetrieb liefen, sinnvoll. Bei letzteren ist eine Bilanzierung wesentlich exakter und ohne Störfaktoren durchführbar.

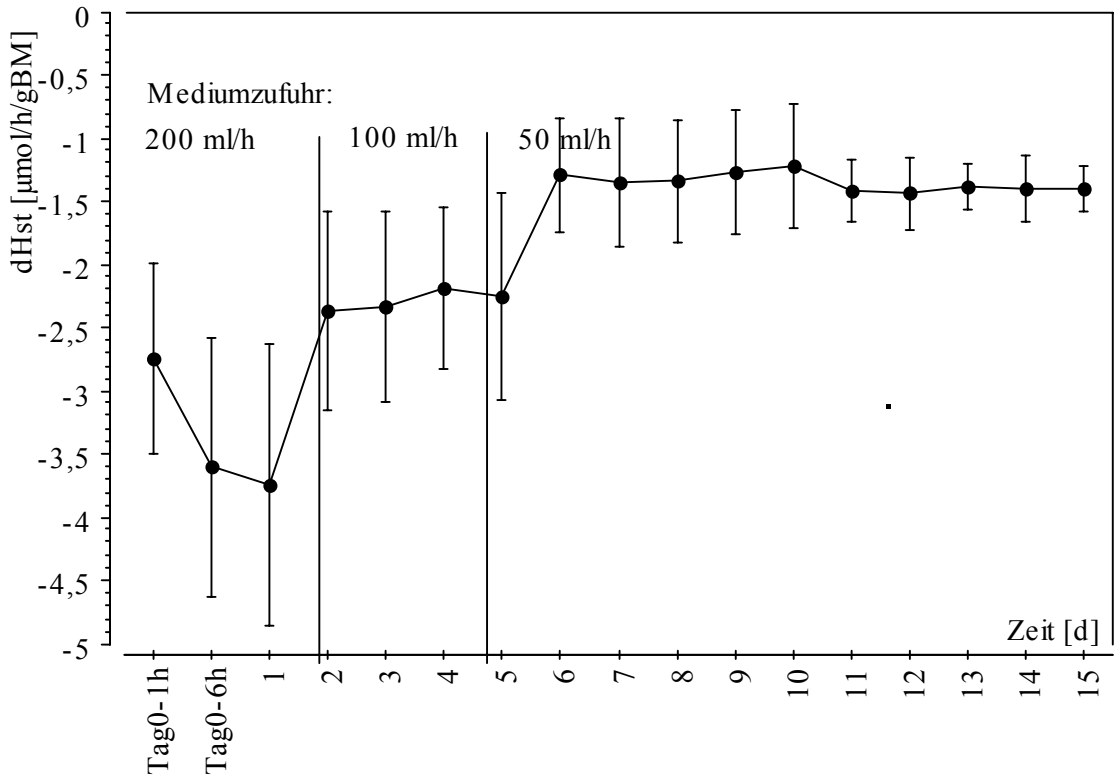

Abb. 29: Netto-Harnstoffbilanz von 7 Bioreaktoren im Zellkulturbetrieb

Die Abbildung zeigt die Harnstoffbilanz von 7 Bioreaktoren, die ausschließlich im Zellkulturbetrieb liefen. Es fällt eine Stufung der Netto-Harnstoffproduktion in Abhängigkeit von der Mediumzufuhr ins Auge, die am ersten Tag 200 ml/h, vom zweiten bis vierten Tag 100 ml/h und ab dem vierten Tag 50 ml/h beträgt (siehe Kapitel 2.10.1). Unter Kulturbedingungen zeigt sich die Harnstoffsynthese konstant in Abhängigkeit von der angebotenen Substratmenge, die durch die Mediumflußrate und die Konzentration an benötigten Aminosäuren im Medium bestimmt wird. Der Mittelwert der Harnstoffsynthese der zur Therapie eingesetzen Bioreaktoren beträgt 2,2 µmol/h/gBM, liegt also im Bereich der Bioreaktoren, die in der Zellkultur 100 ml/h Medium erhielten. Spitzenwerte, die deutlich darüber liegen, wurden gemessen und sind durch ein höheres Substratangebot während der Therapie erklärbar. Der hier durchgeführte Vergleich zwischen Bioreaktoren, die in der Therapie eingesetzt wurden und Bioreaktoren, die im Zellkulturbetrieb liefen, bekräftigt die in 4.7 formulierte Theorie, daß die Stoffwechselleistung

nach oben hin maßgeblich durch die Filtratflußrate des Patientenplasmas begrenzt ist.

Der Stoffwechselverlauf von Patient 2 zeigt, wie problematisch Harnstoff als Indikator der Stoffwechselleistung des Bioreaktors ist. Die starke Zunahme der Konzentration im Plasma des Patienten im Verlauf der gesamten Therapie war auf ein gleichzeitig eintretendes Nierenversagen zurückzuführen. Die Mischungsverhältnisse im Rezirkulationsmodell des extrakorporalen Kreislaufs führen bei einem kontinuierlichen Konzentrationsanstieg zu einem verzögerten Anstieg im Bioreaktor, so daß die errechnete Nettofreisetzung nicht der tatsächlichen Syntheseleistung des Bioreaktors entspricht, sondern höher liegt. Daß eine starke Erhöhung der Harnstoffkonzentration stattfand, ist als positives Zeichen für den Bioreaktor zu werten. Die Restfunktion der eigenen Leber wäre dazu wahrscheinlich nicht mehr in der Lage gewesen. Wenn man in diesem Falle, wie zum Beispiel die Arbeitsgruppe von Demetriou[102] oder auch alle anderen Arbeitsgruppen, die Harnstoffkonzentration vor und nach der Therapie als Referenz für die Stoffwechselaktivität genommen hätte, käme man zu irreführenden Ergebnissen, weil der gesamte Konzentrationsanstieg während der Behandlung dem Bioreaktor zugeschrieben würde.

4.4 Porcines Albumin

Der Nachweis von porcinem Albumin im Patientenplasma ist ein direkter Nachweis für die Stoffwechselaktivität der Hepatozyten im Bioreaktor. Da dieser Stoff ausschließlich von Schweineleberzellen produziert wird, kann hier auf Bilanzierungsmodelle und Berechnungen verzichtet werden, die ihrerseits Risiken der Verzerrung und Fehler enthalten. Porcines Albumin war im Plasma aller Patienten nachweisbar. Das rasche Absinken nach Therapieende spricht für eine anhaltende Stoffwechselaktivität der Hepatozyten bis zum Therapieende. Die Kurven der Schweinealbumin-Spiegel und die Kurven der berechneten Harnstoffsyntheseleistung des Bioreaktors zeigen keine Korrelation. Beide Stoffe sind Syntheseparameter für die Stoffwechselaktivität, beide basieren auf der Funktion sehr unterschiedlicher Enzymsysteme in unterschiedlichen Zellorganellen, so daß ein Nachlassen der Funktion nicht unbedingt gleichsinnig und gleichzeitig zu erwarten ist. Albumin ist gegenüber Harnstoff ein viel größeres Molekül, daher wird es eher in den Poren der Membranen oder im Plasmafilter zurückgehalten, so daß entsprechend mehr synthetisiert wurde als im Patientenplasma nachweisbar ist. Nachteil dieses Parameters ist, daß er nur nachträglich bestimmt werden kann. Die Bestimmung wird in Speziallaboratorien durchgeführt, die Genauigkeit ist nicht vergleichbar mit der standardmäßig bestimmter Parameter. Außerdem kann dieser Parameter nicht für einen Vergleich mit Systemen, die auf humanen Zellinien basieren, herangezogen werden.

4.5 Glucosestoffwechsel

Die Leber hat eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung des Glucosespiegels, entsprechend kritisch ist der Glucosespiegel im ALV.

4.5.1 Glucoseeinstellung der Patienten während der Therapie

Die Glucoseeinstellung der Patienten während der Therapie hat sich als schwierige Aufgabe erwiesen. Einerseits neigen Patienten in akutem Leberversagen zur Hypoglykämie, weil die Leber als glucoseproduzierendes Organ ausfällt. Andererseits reagieren die Patienten auch empfindlich auf Glucosegabe, da die Leber als Speicherorgan in seiner Funktion limitiert ist. Die Glucosespiegel der Patienten waren während der Therapie extremen Schwankungen unterworfen. Besonders gefährlich waren Glucosespitzen, die bei Patienten 2 und 4 gemessen wurden, da bei nachfolgendem raschem Abfall des Glucosespiegels eine weitere Hirndrucksteigerung droht.

4.5.2 Glucosestoffwechsel des Bioreaktors

Der Bioreaktor kann sowohl Glucose als Energiesubstrat aufnehmen und abbauen oder speichern als auch Gluconeogenese leisten. Bei den meisten Bioreaktoren wurde eher Glucose abgegeben. Bei einigen Patienten wurde aber vorübergehend eine Glucoseaufnahme gemessen. Die größte errechnete Glucoseaufnahme der Bioreaktoren wurde bei Patient 4 zum Zeitpunkt der höchsten Glucosespiegel gemessen, so daß eine intelligente Stoffwechselbeeinflussung durch den Bioreaktor wahrscheinlich ist. Aus den Kurven der Glucosefreisetzung und -aufnahme durch die Bioreaktoren ist Stoffwechselaktivität zu erkennen. Die Stoffwechselaktivität geschieht jedoch nicht so gleichmäßig, daß sie im Sinne der Fragestellung für eine Verlaufskontrolle in Frage kommt. Bei anhaltend hohem Glucoseverbrauch durch den Bioreaktor kann der Verdacht auf eine bakterielle Kontamination geäußert werden. Dies war bei keinem Behandlungsverlauf zu beobachten. Bei vorübergehender Glucoseaufnahme durch den Bioreaktor ist nicht auf nachlassende Stoffwechselleistung der Hepatozyten zu schließen.

Mit Glucoseinfusion und Insulininfusion liegen starke Instrumente zur Einstellung des Glucosespiegels bei der Hand, so daß der Einfluß des Bioreaktoren auf den Patienten eine untergeordnete Rolle spielt. Die errechnete Nettofreisetzung von Glucose der Bioreaktoren lag je nach Zellmasse in der Größenordnung 1/40 der Glucoseinfusion. Die Glucoseinfusion mußte im Verlauf der Therapie immer wieder adaptiert und bei einigen Patienten zwischenzeitlich unterbrochen werden, so daß eine schwankende Einflußgröße bestand, die die Bilanzierung für den Bioreaktor erschwerte.

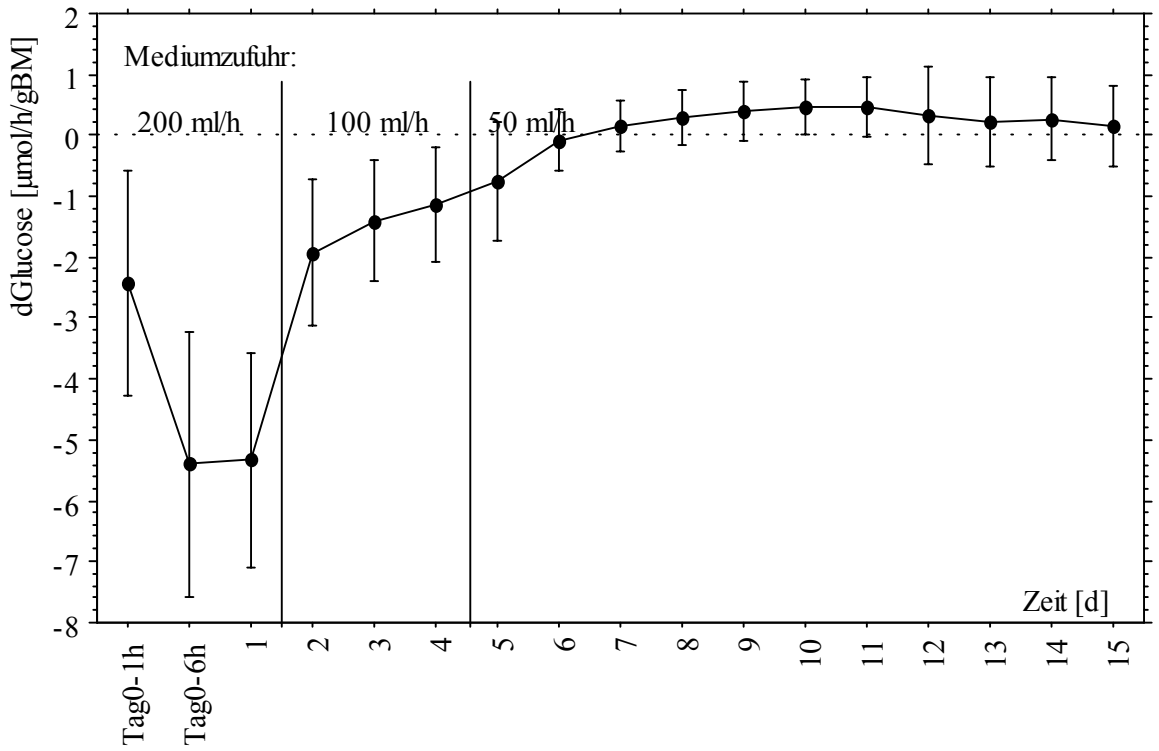

Abb. 30: Glucosebilanz von 14 Bioreaktoren im Zellkulturbetrieb

Bei 14 Bioreaktoren, die ausschließlich im Zellkulturbetrieb liefen, zeigte sich die Glucosebilanz in starker Abhängigkeit vom Alter der Zellkultur. Unmittelbar nach Zellisolierung findet eine starke Glucosefreisetzung statt, die mit einem Entleeren der Glycogenspeicher erklärt werden kann. Die Freisetzung läßt am zweiten Kulturtag stark nach und geht ab dem sechsten Tag in eine Netto-Aufnahme über. Wiederum sieht man eine Abhängigkeit des Stoffumsatzes von der Mediumzufuhr, über die das Substratangebot für den Stoffumsatz gesteuert wird. Wenn man sich das Alter der Zellkulturen, die zur Therapie benutzt wurden (Tabelle 11) und die Glucosebilanz während der Therapie (Abb. 18) ins Gedächtnis ruft, erkennt man, daß die Abhängigkeit von Alter der Zellkultur und Glucosebilanz während der Therapie aufgehoben ist. Die Therapie könnte ähnlich der Zellisolierung eine allgemeine Streßsituation für die Zellen darstellen, so daß sie mit einer katabolen Stoffwechsellage reagieren und eher Glucose freisetzen.

4.6 Laktatstoffwechsel

Der Laktatspiegel der Patienten ist während der Therapie so starken Schwankungen ausgesetzt, daß auf eine Bilanzierung für die Bioreaktoren verzichtet wurde (Verlauf der Spiegel, siehe 3.6). Die Laktatspiegel der Bioreaktoren bewegen sich gleichsinnig wie die der Patienten, so daß sich unregelmäßig eine leichte Nettofreisetzung bzw. -aufnahme abwechseln. Ein Blick auf die

Daten, die im Zellkulturbetrieb gesammelt wurden, verdeutlicht, daß die Bioreaktoren nicht in der Lage waren, Laktat abzubauen; es erfolgte vielmehr eine Nettofreisetzung:

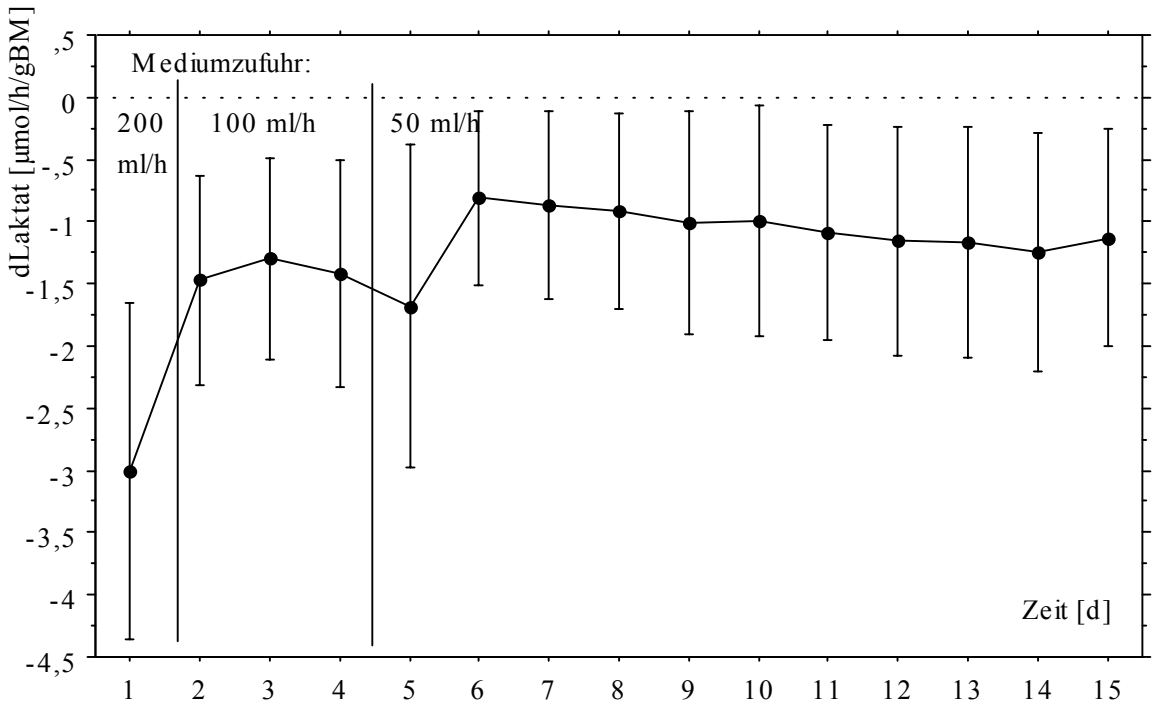

Abb. 31: Laktatbilanz von 15 Bioreaktoren aus dem Zellkulturbetrieb

Die Abbildung zeigt, daß die Bioreaktoren im Zellkulturbetrieb nicht die von Lebergewebe normalerweise erbrachte Senkung der Laktatspiegel durchführen. Sie setzten Laktat frei. Grund dafür könnte eine für entsprechenden Energiebedarf zu niedrige Sauerstoffversorgung sein, so daß Glucose anaerob zu Laktat abgebaut wird. Aber auch eine Zellschädigung kann Laktatfreisetzung hervorrufen. Die Bioreaktoren zeigen während der Therapie ungleich der Situation im reinen Zellkulturbetrieb keine durchgehende Laktatfreisetzung.

4.7 Effektivität hybrider Leberunterstützungssysteme im klinischen Einsatz / Möglichkeiten der Optimierung

An dieser Stelle möchte ich einige Überlegungen und Berechnungen einfügen, um die Effektivität und Leistungsfähigkeit hybrider Leberunterstützungssysteme besser einschätzen zu können. Gleichzeitig können die an sie gerichteten Erwartungen präzisiert werden. Hierzu müssen die leistungslimitierenden Faktoren definiert und betrachtet werden.

Zunächst ist die verwendete Zellmasse entscheidend für die Effektivität der Systeme. Dazu dient ein Vergleich der verschiedenen, zum Einsatz gekommenen Systeme.

Tabelle 16: verwendete Zellmasse verschiedener hybrider Leberunterstützungssysteme

	Zellmasse [g]	**Viabilität [%]**	**max. lebende Zellmasse [g]**	**Prozentsatz der physiologischen Lebermasse**
Margulis[103, 104]	0,68	75,5	0,50	0,03
Sussman[105]	2 x 100	ca. 65 (geschätzt bei Kryokonservierung)	130	8,7
Demetriou[106, 107]	50	65 (Kryokonservierung)	33	2,2
Gerlach	500	97	485	32

Man bedenke, daß die angegebenen Werte die maximal erzielbare Zellausbeute darstellen; es ist jedoch anzunehmen, daß unter Kultur- und insbesondere unter Therapiebedingungen einige Zellen absterben. Aus den Zahlen wird ersichtlich, daß die Therapie mit einem Leberunterstützungssystem von Margulis minimale Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Patienten hat. Die von ihm angegebenen biochemischen Effekte (siehe Kapitel 1.9.3) sind nicht mit der im System verwendeten Zellmasse vereinbar. Ähnlich verhält es sich bei Demetriou, der die gleiche Methodik verwendete, nämlich Plasmakonzentrationen vor und nach der Therapie verglich, um die biochemische Stoffwechselaktivität der Zellen zu überprüfen, und dabei ähnlichen Störfaktoren ausgesetzt ist. Die Zellmasse liegt zwar 50fach höher als bei Margulis, erscheint aber dennoch zu gering, um selbst bei optimalen Bedingungen einen nennenswerten Effekt ausüben zu können. Die von unserer Arbeitsgruppe verwendeten Bioreaktoren einthielten eine mittlere Zellmasse von 284g, somit wesentlich weniger als die unter optimalen Bedingungen erreichbaren 500g. Eine Zellmasse von mindestens 300 g, die mit 20% der physiologischen Zellmasse im Bereich der kritischen Masse für die Leberregeneration[13] liegt, erscheint erstrebenswert.

Bei biochemischen Stoffwechselprozessen in der Leber findet die Umwandlung eines Substrates in ein Stoffwechselprodukt statt. Ein wichtiger limitierender Faktor für den Stoffumsatz ist die Versorgung der Bioreaktoren mit Substrat. Dazu einige Daten zur Leberphysiologie:

- Masse: ca. 1500g

- Durchblutung 1 ml / (min*g Zellen)[108] = 1500 ml/min
- bei einem Hkt von 0,44 ergibt sich ein hepatischer Plasmafluß von 660 ml/min

Bei dem von uns verwendeten Therapiedesign wurde ein mittlerer Plasmafluß für den Bioreaktor von 31 ml/min erzielt. Der Plasmafluß im Bioreaktor ist durch den maximalen Blutfluß in der V. femoralis, aus der mit einem Doppellumenkatheter das Blut gewonnen wird, und durch die Technik der Plasmafiltration, mit der ca. 20% aus dem Volumen des Blutes filtriert werden kann, limitiert. Am Beispiel der Ammoniumentgiftung ergeben sich daher folgende Überlegungen: Die mittlere Ammoniumkonzentration im Plasma aller Patienten an allen Meßzeitpunkten betrug 174 µmol/l, der mittlere Plasmafluß im Bioreaktor betrug 1,9 l/h.

Substratangebot Ammonium: 174 µmol/l * 1,9 l/h = 331 µmol/h oder 7,93 mmol/d

Daraus ist zu folgern, daß selbst bei beliebig hoher Zellmasse im Bioreaktorinnenraum mit perfekter Stoffwechselaktivität maximal, bei kompletter Ammoniumelimination, 7,93 mmol/d aus dem Plasma entfernt werden können. Die normale tägliche Ammoniumbelastung des Menschen liegt jedoch bei 300-500 mmol/d.[13] Wahrscheinlich kann die tägliche Ammoniumbelastung trotz Darmsterilisation mit Elimination ureaseaktiver Bakterien und angepaßter Aminosäureinfusion nicht so weit reduziert werden, daß eine Stoffwechselkapazität von 8 mmol/d ausreichen könnte.

Ähnliche Verhältnisse treffen für andere Stoffwechselwege zu. Die Plasmafiltrationsrate genügt nicht, um die kultivierten Zellen ausreichend mit Substrat zu versorgen. Hier muß alles unternommen werden, die Flußraten zu erhöhen, um der eingesetzten Zellmasse zu Wirkung zu verhelfen.

Tabelle 17: Filtratflußraten verschiedener Leberunterstützungssysteme

	Blutfluß [ml/min]	**Plasma-separation**	**Filtratfluß [ml/min]**	**Therapiedauer pro Tag [h]**	**Plasmafluß pro Tag [l]**
Margulis[109, 110]	80-100	/	/	8	/
Sussman[111]	150-300	Mikrofiltration	30	8	14,4
Demetriou[112]	100	Zentrifugation	50	8	24
Gerlach	150-300	Filtration	30-60	24	43,2-86,4

Ein Blick auf die anderen Systeme zeigt, daß ähnliche Probleme existieren. Mit einem Filtratfluß von 30 ml/min im hLUS wird das zirkulierende Plasma nicht ausreichend ausgetauscht. Die Arbeitsgruppe von Demetriou erzielte einen Filtratfluß, der ähnlich dem unserer Arbeitsgruppe unbefriedigend war; jedoch benötigte die Gruppe dafür einen deutlich niedrigeren Blutfluß. Durch die Zentrifugation kann ein höherer Prozentsatz des Plasmas separiert werden als durch Filtration.

Ein Nachteil der Systeme anderer Arbeitsgruppen ist das Festsetzen der Behandlungszeit auf 8 Stunden pro Tag, während das System unserer Arbeitsgruppe 24 Stunden pro Tag läuft. Alle anderen Systeme können somit noch weniger den erforderlichen Tagesstoffumsatz leisten.

Ein weiteres Problem, das die Effektivität der Therapie begrenzen kann, sind die Durchmischungsverhältnisse im Reaktorinnern. Hierzu gibt es wenig Daten, ein Vergleich zwischen verschiedenen Systemen ist kaum möglich. Dennoch einige Anmerkungen zu dem von uns eingesetzten System: Durch die im Vergleich zu Kulturbedingungen sehr viel höhere Belastung des Systems mit Eiweißen, Zelltrümmern und anderen hochmolekularen Stoffen kommt es zu einem raschen Verstopfen der Poren in den PES-Membranen. Als Folge muß der generell vorzuziehende Perfusionsmodus, bei dem das Plasma von einem Kapillarbündel über den Zwischenraum, in dem sich die Zellen befinden, zum Abfluß in das andere Kapillarbündel übertritt, verlassen werden und auf Grund von Drucksteigerungen in den Diffusionsmodus umgeschaltet werden, bei dem das Plasma direkt über dasselbe Kapillarbündel aus dem System austreten kann. Der Stoffaustausch geschieht entlang der Kapillare über die Poren, ist weniger intensiv, braucht also mehr Zeit und eine höhere Konzentrationsdifferenz. Auf ähnliche Weise könnten auch einzelne Kapillare verstopfen, so daß bestimmte Gebiete verminderten

Stoffaustausch erfahren oder ganz abgeschnitten sind. Hinzu kommt die Verstopfung der Poren der Plasmafilter, die zwar regelmässig ausgetauscht werden, aber zwischenzeitlich einen verminderten Stoffaustausch höhermolekularer Substanzen bewirken. Alternativen zum derzeitigen Stoffaustauschverfahren müssen gesucht werden.

Aktuelle Studien unserer Arbeitsgruppe haben dieses Problem aufgegriffen und durch einige Konfigurationsänderungen im System hervorragende Ergebnisse bei weiteren klinischen Anwendungen erzielt: Im Plasmafilter zirkuliert das Plasma im Gegenstrom zum Blut, so daß Stoffaustausch durch Diffusion entlang der Kapillare durch Konzentrationsgradienten geschieht. Das Blut wird weiterhin mit einer Flußrate von bis zu 300 ml/min entnommen. Das Plasma kann auf Grund technischer Verbesserungen im Innern des Bioreaktors mit 600 ml/min rezirkulieren und gelangt im Gegenstromverfahren in den Plasmafilter. Dadurch, daß das Plasma nicht mehr dem Vollbut entnommen und später wieder zugeführt wird, bleibt eine Konzentrierung des Blutes aus. Daher kann die Heparinisierung der ohnehin bereits blutungsgefährdeten Patienten reduziert werden. Das gesamte System wurde einfacher. Ein zwischengeschalteter Kreislauf und zwei Pumpen, die mehrere Druckmessungen erforderten, konnten eingespart werden. In Farbtracerstudien wurde ein erheblich verbesserter Stoffaustausch gemessen und in weiteren klinischen Anwendungen praktiziert. Theoretisch ist jetzt der Blutfluß aus dem Doppellumenkatheter mit 300 ml/min das limitierende Element im System; der Blutfluß entspricht einem Fünftel des physiologischen Blutstroms durch die Leber.

4.8 Risiken hybrider Leberunterstützungssysteme

Die Risiken hybrider Leberunterstützungssysteme lassen sich in folgender Übersicht in zwei verschiedene Kategorien unterteilen:

Tabelle 18: Risiken hybrider Leberunterstützung

Künstlich	**Biologisch**
Antikoagulation	Transmission
Biokompatibilität	Immunologie

Im folgenden sollen einzelne Aspekte genauer beleuchtet werden.

4.8.1 Antikoagulation

Spontane Blutungen gehören zu den schwersten Komplikationen im akuten Leberversagen.[113] Verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren geht mit einem erhöhten Verbrauch einher. Der

Verbrauch von Gerinnungsfaktoren wird durch Thrombin und Plasminogen angeschoben. Die nekrotischen Leberzellen setzen thromboplastisches Material und Plasminogen setzt aktivierende Faktoren frei.[114] Für die kontinuierliche Plasmaseparation im extrakorporalen Kreislauf muß zusätzlich heparinisiert werden, um eine Koagulation und das Verstopfen von Filtern und Poren zu verhindern. In den Plasmafiltern bleiben zusätzlich Thrombozyten hängen oder werden inaktiviert. Es kommt zu einem Thrombozytenabfall. Die Patienten erhalten daher Thrombozytenkonzentrate und Gerinnungsfaktoren. Man begibt sich auf eine Gratwanderung zwischen notwendiger Antikoagulation und Blutungsgefahr. Es gibt wenig klinische Erfahrung über mögliche Risiken einer über mehrere Tage andauernden kontinuierlichen Plasmaseparation. Die Plasmaseparation ist limitierend für die Therapiedauer und die Menge des Stoffumsatzes.

4.8.2 Biokompatibilität

Studien zeigen, daß schwere Nebenwirkungen der Plasmaseparation wie Blutdruckabfall und Hämaturie mit 1,4% bzw. 0,4% selten sind,[115] dabei kommt es auf die Biokompatibilität der verwendeten Membranen an.[116]

Die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien ergaben keinen Hinweis auf Biokompatibilitätsprobleme. Untersuchungen zur Biokompatibilität der Plasmaseparation im Zusammenhang mit der von Demetriou durchgeführten hLUS ergaben keine schweren Nebenwirkungen. Es wurde lediglich ein signifikanter Abfall der Fibrinogenspiegel gemessen. Außerdem wurde ein Abfall von freiem Calcium festgestellt, weil das Ion mit dem von der Gruppe verwendeten Antikoagulans, Citrat, Chelate bildet.[117]

4.8.3 Transmissionsrisiko durch xenogenen Kontakt

In der Routine werden die für eine Behandlung und den direkten Kontakt mit Humanplasma in Frage kommenden Schweine unter SPF-Bedingungen gehalten und transportiert. Die FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) empfiehlt dazu, zahlreiche Untersuchungen auf bakterielle und virale Erreger durchzuführen.[118]

Trotz Testung der Spendertiere auf alle bekannten Zoonosen können Übertragungen von unbekannten Zoonosen vom Tier auf den Menschen nicht ausgeschlossen werden. In besonderem Maße gilt dies für Primaten, die als Quelle einiger humanpathogener Viren (Marburg Virus und Ebola Virus) in Frage kommen. Aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft zwischen SIV Simian Immunodeficiency Virus und dem HIV Human Immunodeficiency Virus wird auch hier ein Übertragungsweg über die Primaten diskutiert.[119]

Das dauerhafte Überschreiten natürlicher Barrieren zwischen Mensch und Tier bringt eine

Infektionsgefahr mit sich, obwohl durch Tierzucht seit Jahrtausenden ein enger Kontakt bestand, wie das Beispiel BSE (Bovine Spongiforme Enzephalitis) zeigt. Prusiner konnte zeigen, daß die durch Prionen hervorgerufene Krankheit zwischen Spezies übertragbar ist.[120, 121] Es besteht die Befürchtung, daß BSE bei Übertragung auf den Menschen vCJD, eine neue Form der Creutzfeldt-Jakob Disease, auslösen kann. Gleichzeitig wurde das Auftreten einer übertragbaren Form von TSE Transmissible Spongiform Encephalopathy bei Mäusen, Katzen und exotischen Arten von Wiederkäuern beobachtet, so daß eine Ausbreitung der Erkrankung über die Speziesgrenzen hinweg angenommen wird.[122]

Da Schweine unter den Tieren als potentielle Organspender favorisiert werden, gilt dem PERV Porcine Endogenous Retrovirus besondere Aufmerksamkeit. Das PERV-Genom ist in jeder Schweinezelle vorhanden. Das Virus ist infektiös für humane Immunzellen;[123] darüber, wie jedoch das Infektionsrisiko eines Transplantatempfängers oder eines Patienten, der mit einem hLUS basierend auf Schweinehepatozyten behandelt wird, einzuschätzen ist, gibt es unterschiedliche Meinungen in der Literatur. Pitkin et al.[124] untersuchten 28 Patienten, die mit einem hLUS behandelt wurden. Alle waren PERV negativ. Die Autoren fanden, daß der Einsatz semipermeabler Membranen in bioartifiziellen Systemen das Übertragungsrisiko um das 105fache senkt. Paradis et al.[125] untersuchten 160 behandelte Patienten auf PERV. Sie fanden weder eine Virämie, noch konnten sie den Befall mononukleärer Zellen nachweisen. Trotz aller Entwarnungen bleibt die Frage nach Xenozoonosen brisant, denn eine Übertragung von Erregern könnte nicht nur für den Patienten, sondern für die Spezies Mensch schwerwiegende Folgen haben.

Die eigene Arbeitsgruppe untersucht daher die Verwendung primärer humaner Hepatozyten als Alternative.

4.8.4 Immunologische Aspekte

Alle hLUS, die auf tierischen Zellen basieren, verwenden Membranen, um die Zellkultur vor direktem Kontakt und Zerstörung durch immunkompetente Zellen der Patienten zu schützen. Die Porengröße der Membranen ist so gewählt, daß sie für Proteine durchlässig ist, weil der proteingebundene Stoffaustausch erwünscht ist. Damit ist die Membran auch permeabel für Antikörper und Komplementfaktoren, so daß theoretisch eine Aktivierung des Komplementsystems auf klassischem und alternativem Weg stattfinden kann, mit der Gefahr einer Lyse von tierischen Zellen. Natürliche Antikörper des Menschen sind gegen Oberflächenantigene auf PAEC Porcine Aortic Endothelial Cells gerichtet.[126] Versuche von Fujioka et al.[127] zeigten, daß Hepatozyten vom Schwein weniger anfällig für Zytotoxizität

durch natürliche Antikörper sind als Endothelzellen. Baquerizo et al.[128] untersuchten die immunologischen Auswirkungen der Behandlung mit einem hLUS der Arbeitsgruppe Demetriou. Sie fanden bei mehrfacher Anwendung des hLUS einen starken Anstieg der IgM und IgG Xenoantikörper gegen das α-Gal-Oberflächenepitop, das hauptsächlich von PAEC-Zellen ausgeprägt wird. Erste klinische Erfahrungen mit hLUS zeigten keine immunologischen Komplikationen. Dennoch wird ein enges immunulogisches Monitoring der Patienten empfohlen.[129] Außerdem muß man durch den Kontakt mit Fremdmaterialien mit immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen rechnen.

Auch hier wäre die Verwendung humaner Leberzellen von Vorteil.

4.9 Ethische Aspekte

Die gezielte Züchtung und Haltung von Schweinen oder Primaten zur Organspende werfen Fragen zur ethischen Vertretbarkeit auf.[130] Es gibt verschiedene Gründe, aus denen Primaten nur ungern für Xenotransplantationen herangezogen werden. Ihre Ähnlichkeit zum Menschen löst eher Mitgefühl aus, die genetische Ähnlichkeit erhöht das Risiko für die Übertragbarkeit von Infektionskrankheiten. Die Erschöpfbarkeit einiger Arten, die langsamen Vermehrungszyklen und die Aufzucht unter SPF-Bedingungen führen zu erheblichen logistischen Problemen. Das Schwein dagegen vermehrt sich sehr rasch und ist nicht vom Aussterben bedroht, sondern wird seit langer Zeit gezüchtet und verspeist. Die oben besprochenen Infektionsrisiken müssen auch unter ethischen Gesichtspunkten betrachtet und im Sinne eines Verantwortungsbewußtseins ständig weiter untersucht werden. Schließlich gibt es möglicherweise psychologische Probleme oder religiöse Bedenken bei Patienten, die mit tierischen Organen behandelt oder transplantiert werden. Zur weiteren Vertiefung sei auf Texte von Daar et al.[131] und Derenge[132] verwiesen.

Ethische Fragestellungen ergeben sich auch bei der Suche nach neuen Zellquellen. Mehrere Arbeitsgruppen, die sich mit der Kultivierung, Proliferation und in-vitro Differenzierung von embryonalen Stammzellen beschäftigen, hoffen, in Zukunft geeignete Zellinien für Bioreaktoren herstellen zu können.[133, 134, 135] Die aktuelle Rechtsprechung, die auf diesem Gebiet einige Zeit hinter dem wissenschaftlich Möglichen hinterherzieht, ist dabei, klare Richtlinien zu definieren. Noch ist die Rechtsprechung in den einzelnen Ländern der Europäischen Union sehr unterschiedlich. In Deutschland ist der Gebrauch von menschlichen Embryonen zu wissenschaftlichen Zwecken generell verboten. Der Europarat empfiehlt ein Verbot der Herstellung menschlicher Embryonen ausschließlich für die Forschung, äußert sich aber nicht prinzipiell gegen das Verwenden ohnehin anfallenden Materials.[136] In den USA pflegt die

Regierung eine sehr passive Haltung und stellte unter Druck der Öffentlichkeit die Förderung dieser Form der Forschung ein; seither fließt das Geld aus der Industrie. Kirchliche Gruppen hingegen lehnen eine Verwertung menschlicher Embryonen generell ab und fordern dazu auf, Stammzellen aus dem Knochenmark Erwachsener oder aus Plazentargewebe zu gewinnen.[137, 138] Die Kirchen fordern eine strengere Gesetzgebung und bessere Prüfung bei der Vergabe von öffentlichen Geldern. Oft repräsentieren sie die Meinung einer großen Gruppe der Bevölkerung auf Grundlage von emotionalen und intuitiven Gesichtspunkten. Ich denke, daß hier viel Bedarf für Wissenschaftler besteht, die dazu neigen, auf Grundlage pragmatischer Gesichtspunkte das Machbare zu realisieren, sich mit Vertretern aus Politik und Verbänden an einen Tisch zu setzen, um ethische Grundlagen zu diskutieren.

Ethisch wenig problematisch erscheint die Verwendung humaner Hepatozyten aus Organen, die für eine Transplantation entnommen worden sind, anschließend jedoch abgelehnt und ansonsten verworfen werden.

Andere ethische Gesichtspunkte sind zu beachten bei der Indikationsstellung für eine hLUS-Therapie. In der Arbeitsgruppe Demetriou wurde beispielsweise eine Gruppe von 10 Patienten behandelt, die mit akuter Exazerbation chronischer Lebererkrankungen wegen aktiven Alkoholismus oder anderer Gründe nicht für eine Transplantation gelistet waren.[139] Zwei Patienten erholten sich, acht starben wenig später. Die Therapie konnte hier bei terminaler Krankheit nur eine kurze Verzögerung des einsetzenden Todes leisten. Der Einsatz des hLUS war hier ethisch fragwürdig, denn beim heutigen Stand der Technik ist das Einleiten einer spontanen Regeneration durch hLUS noch nicht wahrscheinlich. Es ist nicht sicher, daß die Regeneration bei den beiden Patienten durch die hLUS eingeleitet wurde.

Trotz aller Bedenken ist es wichtig, sich diese Bereiche völlig neuer Technologien und Fragestellungen vorzuwagen.

4.10 Ausblick

4.10.1 Zellquellen

Eine neue Dimension von Möglichkeiten bietet die Verbesserung gentechnologisch hergestellter Humanzellinien. Durch Transfektion mit dem Simian Virus (SV 40) T-Antigen ist es einigen Arbeitsgruppen gelungen, immortalisierte, nicht-tumorogene Zellinien herzustellen. Der Verlust an Stoffwechselfunktion gegenüber primären Zellen ist jedoch erheblich. So produziert beispielsweise die von Liu hergestellte Zellinie HepLiuD63 anfangs noch Albumin, verliert diese Funktion jedoch nach einigen Zellpassagen. Cytochrom-P450-Aktivität konnte nachgewiesen werden. Carbamoylphosphat-Synthetase wurde als Schlüsselenzym der Harnstoffsynthese

ebenfalls nachgewiesen.[140] Harnstoffsynthese können die Zellen allerdings nicht leisten. Außerdem gibt es wenig Erfahrung darüber, wie die Zellen unter Belastung mit Plasma von Patienten in akutem Leberversagen reagieren. Shi et al.[141] fanden, daß Wachstum, DNA-, RNA- und Proteinsynthese einer HepG2-Zellinie durch Kontakt mit Patientenplasma vermindert waren. Morphologische Veränderungen waren erkennbar. Die Autoren empfehlen eine Vorbehandlung des Patientenplasmas, um die Toxinbelastung zu senken.

Die Gewinnung von Leberstammzellen gilt als vielversprechendes Gebiet der Forschung nach neuen Zellquellen. Man erhofft sich eine gezielte Zellproliferation bis zu einer gewünschten Zielgröße und gute Differenzierung. Thomson et al.[142] [143] und Gearhart et al.[144] arbeiten an der Gewinnung pluripotenter embryonaler Stammzellen, mit denen nach anschließender Proliferierung und Differenzierung verschiedene menschliche Gewebe hergestellt werden könnten. Die Durchführung von Versuchen an menschlichen Embryonen wirft nicht nur neue ethische Fragen auf (siehe Seite 86), auch scheint die Proliferierung und Ausdifferenzierung unter Kulturbedingungen in weiter Ferne. Außerdem gibt es Versuche, Stammzellen aus Lebern von Rattenembryonen zu isolieren.[145] Forscher vom Albert Einstein College of Medicine in New York haben Zellinien aus Lebern von Rattenembryonen gewonnen und zu einem gewissen Differenzierungsgrad gebracht.[146, 147, 148] Michalopoulos konnte auch im Knochenmark Hepatic Oval Cells (HOV) identifizieren, von denen angenommen wird, daß sie bipotent sind und sowohl in Hepatozyten als auch in Gallengangepithel differenzieren können.[149, 150] Eine japanische Arbeitsgruppe konnte durch Transfektion von HGF über ein Adenovirus die Proliferation von HOV in vivo stimulieren.[151]

Forscher aus der Gruppe von Demetriou gewannen Hepatozyten aus menschlichen Organen, die wegen Steatose und Alter der Spender von allen Transplantationszentren abgelehnt wurden. Nach Isolierung wurden leberspezifische Funktionen in Kultur gemessen.[152] Studien mit humanen Hepatozyten als Zellquelle für den Einsatz im Bioreaktor aus Organen, die für eine Transplantation entnommen, aber anschließend abgelehnt wurden, laufen gegenwärtig in der eigenen Arbeitsgruppe. Die Organe sind nicht von ausreichender Qualität, um eine Transplantation zu verantworten, jedoch genügend um funktionstüchtige Hepatozyten zu isolieren und temporäre Leberunterstützung zu leisten. Es wurden in ersten klinischen Anwendungen hervorragende Ergebnisse erzielt. Nachteil ist, daß man damit auch auf das Eintreffen von Spenderorganen angewiesen ist und nicht wie bei Schweinelebern beliebig viele zu jedem bestimmbaren Zeitpunkt zur Verfügung hat. Der Vorteil ist, daß die unter 4.8.3 genannten Risiken der Transmission durch Xenokontakt wegfallen und die unter 4.8.4 genannten

Risiken nur bedingt zu treffen.

4.10.2 Qualitätssicherung hybrider Leberunterstützungssysteme

Für die Zukunft wäre es wünschenswert, einen internationalen, vergleichbaren Standard für die Stoffwechselaktivität hybrider Leberunterstützungssysteme zu haben. Damit könnten eine Qualitätssicherung der Kultur vor der Therapie, eine engmaschige und schnelle Überprüfung während der Therapie und eine retrospektive Analyse durch aufwendig in Speziallaboratorien zu bestimmende Parameter im Anschluß an die Therapie erfolgen. Wenn man als Basis die Freisetzung bzw. Aufnahme eines Stoffes pro Stunde heranzieht und sie auf ein Gramm Zellmasse bezieht, werden die unterschiedlichen Systeme, die international zum Einsatz kommen, untereinander vergleichbar. Anschließend kann man über die Empfehlung einer Mindestzellmasse diskutieren, die den Einsatz eines Systems rechtfertigt.

Zusätzlich gilt es, weitere Parameter, die für eine Verlaufskontrolle und Qualitätssicherung während der Therapie in Frage kommen, zu erforschen. Spezifische Leberenzyme wie ALT und AST sowie die weniger spezifischen Parameter LDH und GLDH können in-vitro als Marker für die Zellqualität herangezogen werden.[153] Während der Therapie gibt es aber den Nachteil, daß im Patientenplasma durch den Zerfall der eigenen Leber enorme Konzentrationen dieser Enzyme bereits vorhanden sind, somit ein weiterer Anstieg nur schwer zu entdecken wäre. Außerdem ist die Molekülgröße ein Nachteil für die Passage von Membranen und Filtern.

Bilirubin ist ein weiterer Parameter, den es zu analysieren gilt. Hepatozytenkulturen sind in der Lage, Bilirubin zu konjugieren. Die Konzentration des direkten Bilirubins müßte nach Durchfließen des Bioreaktors erhöht sein gegenüber der Konzentration des indirekten Bilirubins.

Ein weiteres ungelöstes Problem aller hLUS ist die Entkoppelung vom enterohepatischen Kreislauf. Die exkretorische Funktion der Leber kann nicht erfüllt werden. Gallensalze können nicht direkt in den Darm sezerniert werden. Konjugierte Stoffe können in das Plasma freigesetzt werden und eventuell über die Nieren ausgeschieden werden. Wegen der Komplexität der Einflußfaktoren bleibt eine weitere Erforschung notwendig.

Trotz der diskutierten Nachteile und Risiken der hybriden Leberunterstützung sollten auf diesem jungen Gebiet der Forschung im Sinne der Patienten und der Wissenschaft alle Anstrengungen unternommen werden, um weitere Entwicklungen voranzutreiben.

Literaturverzeichnis

[1] Trey, C. und Davidson, C. S. (1970): The management of fulminant hepatic failure, Prog.Liver Dis. (Band 3:282-98), Seite 282-298.

[2] O'Grady, J. G. und Williams, R. (1986): Management of acute liver failure, Schweiz.Med.Wochenschr. (Band 116), Nr. 17, Seite 541-544.

[3] Bernal, W. und Wendon, J. (1999): Acute liver failure; clinical features and management, Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. (Band 11), Nr. 9, Seite 977-984.

[4] Lee, W. M. (1993): Acute liver failure [published erratum appears in N Engl J Med 1994 Feb 24;330(8):584] [see comments], N.Engl.J.Med. (Band 329), Nr. 25, Seite 1862-1872.

[5] Lee, W. M. (1993): Acute liver failure [published erratum appears in N Engl J Med 1994 Feb 24;330(8):584] [see comments], N.Engl.J.Med. (Band 329), Nr. 25, Seite 1862-1872.

[6] O'Grady, J. G. und Williams, R. (1993): Classification of acute liver failure [letter], Lancet (Band 342), Nr. 8873, Seite 743.

[7] Horn, N.; Unger, J. und Rossaint, R. (1999): [Extracorporeal liver assist devices in acute liver failure], Anaesthesist. (Band 48), Nr. 6, Seite 387-394.

[8] McCashland, T. M.; Shaw, B. W. Jr und Tape, E. (1996): The American experience with transplantation for acute liver failure, Semin.Liver Dis. (Band 16), Nr. 4, Seite 427-433.

[9] Plevris, J. N.; Schina, M. und Hayes, P. C. (1998): Review article: the management of acute liver failure, Aliment.Pharmacol.Ther. (Band 12), Nr. 5, Seite 405-418.

[10] Gerok, W. (1985): [Metabolic principles in hepatic encephalopathy], Internist.(Berl.) (Band 26), Nr. 7, Seite 377-387.

[11] Gerok, W. und Haussinger, D. (1984): [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver], Med.Welt. (Band 35), Nr. 1-2, Seite 28-34.

[12] Butterworth, R. F.; Giguere, J. F.; Michaud, J.; Lavoie, J. und Layrargues, G. P. (1987): Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, Neurochem.Pathol. (Band 6), Nr. 1-2, Seite 1-12.

[13] Arias, I. M.; Boyer, J. L.; Fausto, N.; Jakoby, W. B.; Schachter, D. A. und Shafritz, D. A. (1994): The liver: biology and pathobiology (Band 3rd edition), Raven Press, Ltd. New York.

[14] Gerok, W. and Haussinger, D.

[15] Gerok, W. (1985): [Metabolic principles in hepatic encephalopathy], Internist.(Berl.) (Band 26), Nr. 7, Seite 377-387.

[16] Gerok, W. und Haussinger, D. (1984): [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver], Med.Welt. (Band 35), Nr. 1-2, Seite 28-34.

[17] Butterworth, R. F.; Giguere, J. F.; Michaud, J.; Lavoie, J. und Layrargues, G. P. (1987): Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, Neurochem.Pathol. (Band 6), Nr. 1-2, Seite 1-12.

[18] Hazell, A. S. und Butterworth, R. F. (1999): Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (Band 222), Nr. 2, Seite 99-112.

[19] Butterworth, R. F. (1998): Effects of hyperammonaemia on brain function, J.Inherit.Metab.Dis. (Band 21 Suppl 1:6-20), Seite 6-20.

[20] Hawkins, R. A. und Jessy, J. (1991): Hyperammonaemia does not impair brain function in the absence of net glutamine synthesis, Biochem.J. (Band 277), Nr. Pt 3, Seite 697-703.

[21] Hazell, A. S. und Butterworth, R. F. (1999): Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (Band 222), Nr. 2, Seite 99-112.

[22] Zieve, L. (1981): The mechanism of hepatic coma, Hepatology (Band 1), Nr. 4, Seite 360-365.

[23] Krebs, H. A.; Hems, R.; Lund, P.; Halliday, D. und Read, W. W. (1978): Sources of ammonia for mammalian urea synthesis, Biochem.J. (Band 176), Nr. 3, Seite 733-737.

[24] Haussinger, D. (1990): Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance, Biochem.J. (Band 267), Nr. 2, Seite 281-290.

[25] Nissim, I.; Brosnan, M. E.; Yudkoff, M. und Brosnan, J. T. (1999): Studies of hepatic glutamine metabolism in the perfused rat liver with (15)N-labeled glutamine, J.Biol.Chem. (Band 274), Nr. 41, Seite 28958-28965.

[26] Haussinger, D. (1986): Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle, Adv.Enzyme Regul. (Band 25:159-80), Seite 159-180.

[27] Lardner, A. L. und O'Donovan, D. J. (1998): Alterations in renal and hepatic nitrogen metabolism in rats during HCl ingestion, Metabolism (Band 47), Nr. 2, Seite 163-167.

[28] van den Berghe, G. (1991): The role of the liver in metabolic homeostasis: implications for inborn errors of metabolism, J.Inherit.Metab.Dis. (Band 14), Nr. 4, Seite 407-420.

[29] DeFronzo, R. A. und Ferrannini, E. (1987): Regulation of hepatic glucose metabolism in humans, Diabetes Metab.Rev. (Band 3), Nr. 2, Seite 415-459.

[30] Thorens, B. (1992): Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter, Int.Rev.Cytol. (Band 137:209-38), Seite 209-238.

[31] Cherrington, A. D.; Stevenson, R. W.; Steiner, K. E.; Davis, M. A.; Myers, S. R.; Adkins, B. A.; Abumrad, N. N. und Williams, P. E. (1987): Insulin, glucagon, and glucose as regulators of hepatic glucose uptake and production in vivo, Diabetes Metab.Rev. (Band 3), Nr. 1, Seite 307-332.

[32] Gardemann, A.; Puschel, G. P. und Jungermann, K. (1992): Nervous control of liver metabolism and hemodynamics, Eur.J.Biochem. (Band 207), Nr. 2, Seite 399-411.

[33] Ohno, K. und Maier, P. (1994): Cultured rat hepatocytes adapt their cellular glycolytic activity and adenylate energy status to tissue oxygen tension: influences of extracellular matrix components, insulin and glucagon, J.Cell Physiol. (Band 160), Nr. 2, Seite 358-366.

[34] Potin, M. und Perret, C. (1990): [Lactic acidosis and hyperlactatemia], Rev.Prat. (Band 40), Nr. 22, Seite 2042-2046.

[35] Zabrodski, R. M. und Schnurr, L. P. (1984): Anion gap acidosis with hypoglycemia in acetaminophen toxicity, Ann.Emerg.Med. (Band 13), Nr. 10, Seite 956-959.

[36] Silva, Y. J.; Parameswaran, P. G. und James, P. (1976): Exchange transfusion and

major surgery in acute hepatic failure, Surgery (Band 80), Nr. 3, Seite 343-349.

[37] Horisawa, M. und Reynolds, T. B. (1976): Exchange transfusion in hepatorenal syndrome with liver disease, Arch.Intern.Med. (Band 136), Nr. 10, Seite 1135-1137.

[38] Kondrup, J.; Almdal, T.; Vilstrup, H. und Tygstrup, N. (1992): High volume plasma exchange in fulminant hepatic failure, Int.J.Artif.Organs (Band 15), Nr. 11, Seite 669-676.

[39] Matsubara, S. (1994): Combination of plasma exchange and continuous hemofiltration as temporary metabolic support for patients with acute liver failure, Artif.Organs (Band 18), Nr. 5, Seite 363-366.

[40] Freeman, J. G.; Matthewson, K. und Record, C. O. (1986): Plasmapheresis in acute liver failure, Int.J.Artif.Organs (Band 9), Nr. 6, Seite 433-438.

[41] Pott, G.; Krummenerl, T.; Lohmann, J. und Gerlach, U. (1983): [Diagnosis of acute liver failure], Dtsch.Med.Wochenschr. (Band 108), Nr. 35, Seite 1324-1327.

[42] McCauley, J.; Gaynord, M.; Hrinya, M. und Starzl, T. E. (1993): Dialysis in liver failure and liver transplantation, Transplant.Proc. (Band 25), Nr. 2, Seite 1740.

[43] Davenport, A. und Kirby, S. A. (1995): Intensive care management of patients with acute hepatic and renal failure, Contrib.Nephrol. (Band 116:22-7), Seite 22-27.

[44] Ash, S. R. (1994): Hemodiabsorption in treatment of acute hepatic failure and chronic cirrhosis with ascites, Artif.Organs (Band 18), Nr. 5, Seite 355-362.

[45] O'Grady, J. G.; Gimson, A. E.; O'Brien, C. J.; Pucknell, A.; Hughes, R. D. und Williams, R. (1988): Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure, Gastroenterology (Band 94), Nr. 5 Pt 1, Seite 1186-1192.

[46] Tung, L. C.; Haring, R.; Waldschmidt, J. und Weber, D. (1980): [Experience in treating hepatic coma by extracorporal liver perfusion (author's transl)], Zentralbl.Chir. (Band 105), Nr. 18, Seite 1195-1205.

[47] Fox, I. J.; Langnas, A. N.; Fristoe, L. W.; Shaefer, M. S.; Vogel, J. E.; Antonson, D. L.; Donovan, J. P.; Heffron, T. G.; Markin, R. S. und Sorrell, M. F. (1993): Successful application of extracorporeal liver perfusion: a technology whose time has come, Am.J.Gastroenterol. (Band 88), Nr. 11, Seite 1876-1881.

[48] Waldschmidt, J.; Beck, G.; Botsch, H.; Dressler, S.; Hauck, W.; Haring, R.; Perez, R. de; Stallkamp, B. und Tung, L. C. (1971): [Clinical and experimental experiences with liver perfusion], Z.Exp.Chir. (Band 4), Nr. 4, Seite 209-215.

[49] Lie, T. S.; Dengler, H. J.; Gutgemann, A.; Rommelsheim, K.; Lelbach, W. K.; Holst, A.; Marsteller, H. J.; Ueda, T.; Muller, J.; Klehr, U.; von Bergmann, K.; Kutzner, M.; Speck, D. und Gundermann, K. J. (1977): [Extracorporeal perfusion with baboon liver in the treatment of hepatic coma (author's transl)], Dtsch.Med.Wochenschr. (Band 102), Nr. 42, Seite 1506-1511.

[50] Abouna, G. M. (1968): Experience with extracorporeal pig liver perfusion in the treatment of hepatic coma, Gut (Band 9), Nr. 6, Seite 730-731.

[51] Abouna, G. M.; Garry, R.; Hull, C.; Kirkley, J. und Walder, D. N. (1968): Pig-liver perfusion in hepatic coma, Lancet (Band 2), Nr. 7566, Seite 509-510.

[52] Chari, R. S.; Collins, B. H.; Magee, J. C.; DiMaio, J. M.; Kirk, A. D.; Harland, R. C.; McCann, R. L.; Platt, J. L. und Meyers, W. C. (1994): Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation [see comments], N.Engl.J.Med. (Band 331), Nr. 4, Seite 234-237.

[53] Satoh, S.; Terajima, H.; Yagi, T.; Kanazawa, A.; Shinohara, H.; Gomi, T.; Uesugi,

T.; Yoneyama, T.; Ikai, I.; Takahashi, R.; Yamamoto, M. und Yamaoka, Y. (1997): Humoral injury in porcine livers perfused with human whole blood, Transplantation (Band 64), Nr. 8, Seite 1117-1123.

[54] Hammer, C. (1994): Fundamental problems of xenotransplantation, Pathol.Biol.(Paris.) (Band 42), Nr. 3, Seite 203-207.

[55] Abouna, G. M.; Cook, J. S.; Fisher, L. M.; Still, W. J.; Costa, G. und Hume, D. M. (1972): Treatment of acute hepatic coma by ex vivo baboon and human liver perfusions, Surgery (Band 71), Nr. 4, Seite 537-546.

[56] Terajima, H.; Shirakata, Y.; Yagi, T.; Mashima, S.; Shinohara, H.; Satoh, S.; Arima, Y.; Gomi, T.; Hirose, T.; Takahashi, R.; Ikai, I.; Morimoto, T.; Inamoto, T.; Yamamoto, M. und Yamaoka, Y. (1997): Successful long-term xenoperfusion of the pig liver: continuous administration of prostaglandin E1 and insulin, Transplantation (Band 63), Nr. 4, Seite 507-512.

[57] Xu, Y.; Lorf, T.; Sablinski, T.; Gianello, P.; Bailin, M.; Monroy, R.; Kozlowski, T.; Awwad, M.; Cooper, D. K. und Sachs, D. H. (1998): Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a Galalpha1-3Galbeta1-4betaGlc-X immunoaffinity column, Transplantation (Band 65), Nr. 2, Seite 172-179.

[58] Pascher, A.; Poehlein, C.; Stangl, M.; Hoebel, G.; Thiery, J.; Mueller-Derlich, J. und Hammer, C. (1997): Application of immunoapheresis for delaying hyperacute rejection during isolated xenogeneic pig liver perfusion, Transplantation (Band 63), Nr. 6, Seite 867-875.

[59] Fung, J.; Rao, A. und Starzl, T. (1997): Clinical trials and projected future of liver xenotransplantation, World J.Surg. (Band 21), Nr. 9, Seite 956-961.

[60] Starzl, T. E.; Fung, J.; Tzakis, A.; Todo, S.; Demetris, A. J.; Marino, I. R.; Doyle, H.; Zeevi, A.; Warty, V. und Michaels, M. (1993): Baboon-to-human liver transplantation [see comments], Lancet (Band 341), Nr. 8837, Seite 65-71.

[61] Starzl, T. E.; Tzakis, A.; Fung, J. J.; Todo, S.; Demetris, A. J.; Manez, R.; Marino, I. R.; Valdivia, L. und Murase, N. (1994): Prospects of clinical xenotransplantation, Transplant.Proc. (Band 26), Nr. 3, Seite 1082-1088.

[62] Hering, S.; Griffin, B. E. und Strauss, M. (1991): Immortalization of human fetal sinusoidal liver cells by polyoma virus large T antigen, Exp.Cell Res. (Band 195), Nr. 1, Seite 1-7.

[63] Sandig, V.; Hofmann, C.; Steinert, S.; Jennings, G.; Schlag, P. und Strauss, M. (1996): Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors, Hum.Gene Ther. (Band 7), Nr. 16, Seite 1937-1945.

[64] Alison, M. R.; Golding, M. H. und Sarraf, C. E. (1996): Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree, Cell Prolif. (Band 29), Nr. 7, Seite 373-402.

[65] Brill, S.; Holst, P.; Sigal, S.; Zvibel, I.; Fiorino, A.; Ochs, A.; Somasundaran, U. und Reid, L. M. (1993): Hepatic progenitor populations in embryonic, neonatal, and adult liver, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (Band 204), Nr. 3, Seite 261-269.

[66] Sigal, S. H.; Brill, S.; Fiorino, A. S. und Reid, L. M. (1992): The liver as a stem cell and lineage system, Am.J.Physiol. (Band 263), Nr. 2 Pt 1, Seite G139-G148.

[67] Kim, B. H.; Sung, S. R.; Choi, E. H.; Kim, Y. I.; Kim, K. J.; Dong, S. H.; Kim, H. J.; Chang, Y. W.; Lee, J. I. und Chang, R.: Dedifferentiation of conditionally immortalized hepatocytes with long-term in vitro passage [In Process Citation],

Exp.Mol.Med.2000.Mar.31.;32.(1.):29.-37. (Band 32), Nr. 1, Seite 29-37.

[68] Enosawa, S.; Suzuki, S.; Fujino, M.; Amemiya, H.; Omasa, T.; Urayama, S.; Tanimura, N. und Suga, K. (1997): An attempt to add biological functions by genetic engineering in order to produce high-performance bioreactor cells for hybrid artificial liver: transfection of glutamine synthetase into Chinese hamster ovary (CHO) cell, Cell Transplant. (Band 6), Nr. 5, Seite 537-540.

[69] Catapano, G.; Di Lorenzo, M. C.; Della, Volpe C.; De Bartolo, L. und Migliaresi, C. (1996): Polymeric membranes for hybrid liver support devices: the effect of membrane surface wettability on hepatocyte viability and functions, J.Biomater.Sci.Polym.Ed. (Band 7), Nr. 11, Seite 1017-1027.

[70] Gerlach, J. C.; Schnoy, N.; Encke, J.; Smith, M. D.; Muller, C. und Neuhaus, P. (1995): Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartment capillary systems: electron microscopy studies, Hepatology (Band 22), Nr. 2, Seite 546-552.

[71] Gerlach, J. C.; Schnoy, N.; Vienken, J.; Smith, M. und Neuhaus, P. (1996): Comparison of hollow fibre membranes for hepatocyte immobilisation in bioreactors, Int.J.Artif.Organs (Band 19), Nr. 10, Seite 610-616.

[72] Berry, M. N. und Friend, D. S. (1969): High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study, J.Cell Biol. (Band 43), Nr. 3, Seite 506-520.

[73] Seglen, P. O. (1972): Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca 2+ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver, Exp.Cell Res. (Band 74), Nr. 2, Seite 450-454.

[74] Seglen, P. O. (1973): Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion, Exp.Cell Res. (Band 76), Nr. 1, Seite 25-30.

[75] Seglen, P. O. (1973): Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion, Exp.Cell Res. (Band 82), Nr. 2, Seite 391-398.

[76] Gerlach, J. C.; Brombacher, J.; Courtney, J. M. und Neuhaus, P. (1993): Nonenzymatic versus enzymatic hepatocyte isolation from pig livers for larger scale investigations of liver cell perfusion systems, Int.J.Artif.Organs (Band 16), Nr. 9, Seite 677-681.

[77] Gerlach, J. C.; Brombacher, J.; Kloppel, K.; Schnoy, N. und Neuhaus, P. (1994): Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers, Transplantation (Band 57), Nr. 9, Seite 1318-1322.

[78] Gerlach, J.; Brombacher, J.; Smith, M. und Neuhaus, P. (1996): High yield hepatocyte isolation from pig livers for investigation of hybrid liver support systems: influence of collagenase concentration and body weight, J.Surg.Res. (Band 62), Nr. 1, Seite 85-89.

[79] Bhatia, S. N.; Toner, M.; Tompkins, R. G. und Yarmush, M. L. (1994): Selective adhesion of hepatocytes on patterned surfaces, Ann.N.Y.Acad.Sci. (Band 745:187-209), Seite 187-209.

[80] Loreal, O.; Levavasseur, F.; Fromaget, C.; Gros, D.; Guillouzo, A. und Clement, B. (1993): Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix in vitro, Am.J.Pathol. (Band 143), Nr. 2, Seite 538-544.

[81] Bader, A.; Knop, E.; Kern, A.; Boker, K.; Fruhauf, N.; Crome, O.; Esselmann, H.; Pape, C.; Kempka, G. und Sewing, K. F. (1996): 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes-design of an organotypical model, Exp.Cell Res. (Band 226), Nr. 1, Seite 223-233.

[82] Fujita, M.; Spray, D. C.; Choi, H.; Saez, J.; Jefferson, D. M.; Hertzberg, E.; Rosenberg, L. C. und Reid, L. M. (1986): Extracellular matrix regulation of cell-cell communication and tissue-specific gene expression in primary liver cultures, Prog.Clin.Biol.Res. (Band 226:333-60), Seite 333-360.

[83] te, Velde AA; Flendrig, L. M.; Ladiges, N. C. und Chamuleau, R. A. (1997): Immunological consequences of the use of xenogeneic hepatocytes in a bioartificial liver for acute liver failure, Int.J.Artif.Organs (Band 20), Nr. 4, Seite 229-233.

[84] Michalopoulos, G. K. (1995): HGF in liver regeneration and tumor promotion, Prog.Clin.Biol.Res. (Band 391:179-85), Seite 179-185.

[85] Stolz, D. B. und Michalopoulos, G. K. (1994): Comparative effects of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor on motility, morphology, mitogenesis, and signal transduction of primary rat hepatocytes, J.Cell Biochem. (Band 55), Nr. 4, Seite 445-464.

[86] Dich, J.; Vind, C. und Grunnet, N. (1988): Long-term culture of hepatocytes: effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity, Hepatology (Band 8), Nr. 1, Seite 39-45.

[87] Busse, B. und Gerlach, J. C. (1999): Bioreactors for hybrid liver support: historical aspects and novel designs, Ann.N.Y.Acad.Sci. (Band 875:326-39), Seite 326-339.

[88] Kay, M. A. und Fausto, N. (1997): Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies, Mol.Med.Today (Band 3), Nr. 3, Seite 108-115.

[89] Chen, S. C.; Hewitt, W. R.; Watanabe, F. D.; Eguchi, S.; Kahaku, E.; Middleton, Y.; Rozga, J. und Demetriou, A. A. (1996): Clinical experience with a porcine hepatocyte-based liver support system, Int.J.Artif.Organs (Band 19), Nr. 11, Seite 664-669.

[90] Watanabe, F. D.; Mullon, C. J.; Hewitt, W. R.; Arkadopoulos, N.; Kahaku, E.; Eguchi, S.; Khalili, T.; Arnaout, W.; Shackleton, C. R.; Rozga, J.; Solomon, B. und Demetriou, A. A. (1997): Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial, Ann.Surg. (Band 225), Nr. 5, Seite 484-491.

[91] Rozga, J.; Holzman, M. D.; Ro, M. S.; Griffin, D. W.; Neuzil, D. F.; Giorgio, T.; Moscioni, A. D. und Demetriou, A. A. (1993): Development of a hybrid bioartificial liver, Ann.Surg. (Band 217), Nr. 5, Seite 502-509.

[92] Arkadopoulos, N.; Detry, O.; Rozga, J. und Demetriou, A. A. (1998): Liver assist systems: state of the art, Int.J.Artif.Organs (Band 21), Nr. 12, Seite 781-787.

[93] Rozga, J.; Podesta, L.; LePage, E.; Morsiani, E.; Moscioni, A. D.; Hoffman, A.; Sher, L.; Villamil, F.; Woolf, G. und McGrath, M. (1994): A bioartificial liver to treat severe acute liver failure, Ann.Surg. (Band 219), Nr. 5, Seite 538-544.

[94] Detry, O.; Arkadopoulos, N.; Ting, P.; Kahaku, E.; Watanabe, F. D.; Rozga, J. und Demetriou, A. A. (1999): Clinical use of a bioartificial liver in the treatment of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure, Am.Surg. (Band 65), Nr. 10, Seite 934-938.

[95] Sussman, N. L. und Kelly, J. H. (1997): Extracorporeal liver support: cell-based therapy for the failing liver, Am.J.Kidney Dis. (Band 30), Nr. 5 Suppl 4, Seite S66-S71.

[96] Nyberg, S. L.; Remmel, R. P.; Mann, H. J.; Peshwa, M. V.; Hu, W. S. und Cerra, F. B. (1994): Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver, Ann.Surg. (Band 220), Nr. 1, Seite 59-67.

[97] Margulis, M. S.; Erukhimov, E. A.; Andreiman, L. A. und Viksna, L. M. (1989):

Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency, Resuscitation. (Band 18), Nr. 1, Seite 85-94.

[98] Margulis, M. S.; Erukhimov, E. A.; Andreiman, L. A.; Kuznetsov, K. A.; Viksna, L. M.; Kuznetsov, A. I. und Deviatov, V. V. (1992): [The use of hemoperfusion through a suspension of cryopreserved hepatocytes in acute liver failure], Vestn.Khir.Im.I.I.Grek. (Band 148), Nr. 1, Seite 83-87.

[99] Thomas, L. (1988): Labor und Diagnose, Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg.

[100] Haussinger, D. (1990): Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance, Biochem.J. (Band 267), Nr. 2, Seite 281-290.

[101] Haussinger, D. (1990): Liver glutamine metabolism, JPEN.J.Parenter.Enteral.Nutr. (Band 14), Nr. 4 Suppl, Seite 56S-62S.

[102] Arkadopoulos, N.; Detry, O.; Rozga, J. und Demetriou, A. A. (1998): Liver assist systems: state of the art, Int.J.Artif.Organs (Band 21), Nr. 12, Seite 781-787.

[103] Margulis, M. S.; Erukhimov, E. A.; Andreiman, L. A. und Viksna, L. M. (1989): Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency, Resuscitation. (Band 18), Nr. 1, Seite 85-94.

[104] Margulis, M. S.; Erukhimov, E. A.; Andreiman, L. A.; Kuznetsov, K. A.; Viksna, L. M.; Kuznetsov, A. I. und Deviatov, V. V. (1992): [The use of hemoperfusion through a suspension of cryopreserved hepatocytes in acute liver failure], Vestn.Khir.Im.I.I.Grek. (Band 148), Nr. 1, Seite 83-87.

[105] Sussman, N. L. und Kelly, J. H. (1997): Extracorporeal liver support: cell-based therapy for the failing liver, Am.J.Kidney Dis. (Band 30), Nr. 5 Suppl 4, Seite S66-S71.

[106] Watanabe, F. D.; Mullon, C. J.; Hewitt, W. R.; Arkadopoulos, N.; Kahaku, E.; Eguchi, S.; Khalili, T.; Arnaout, W.; Shackleton, C. R.; Rozga, J.; Solomon, B. und Demetriou, A. A. (1997): Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial, Ann.Surg. (Band 225), Nr. 5, Seite 484-491.

[107] Rozga, J.; Holzman, M. D.; Ro, M. S.; Griffin, D. W.; Neuzil, D. F.; Giorgio, T.; Moscioni, A. D. und Demetriou, A. A. (1993): Development of a hybrid bioartificial liver, Ann.Surg. (Band 217), Nr. 5, Seite 502-509.

[108] Greenway, C. V. und Stark, R. D. (1971): Hepatic vascular bed, Physiol.Rev. (Band 51), Nr. 1, Seite 23-65.

[109] Margulis, M. S.; Erukhimov, E. A.; Andreiman, L. A. und Viksna, L. M. (1989): Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency, Resuscitation. (Band 18), Nr. 1, Seite 85-94.

[110] Margulis, M. S.; Erukhimov, E. A.; Andreiman, L. A.; Kuznetsov, K. A.; Viksna, L. M.; Kuznetsov, A. I. und Deviatov, V. V. (1992): [The use of hemoperfusion through a suspension of cryopreserved hepatocytes in acute liver failure], Vestn.Khir.Im.I.I.Grek. (Band 148), Nr. 1, Seite 83-87.

[111] Sussman, N. L. und Kelly, J. H. (1997): Extracorporeal liver support: cell-based therapy for the failing liver, Am.J.Kidney Dis. (Band 30), Nr. 5 Suppl 4, Seite S66-S71.

[112] Rozga, J.; Holzman, M. D.; Ro, M. S.; Griffin, D. W.; Neuzil, D. F.; Giorgio, T.; Moscioni, A. D. und Demetriou, A. A. (1993): Development of a hybrid bioartificial liver,

Ann.Surg. (Band 217), Nr. 5, Seite 502-509.

[113] Aldersley, M. A. und O'Grady, J. G. (1995): Hepatic disorders. Features and appropriate management, Drugs (Band 49), Nr. 1, Seite 83-102.

[114] Egbring, R. und Seitz, R. (1990): Improved prognosis of fulminant hepatic failure (FHF) after plasma derivative replacement therapy. Enhanced proteolysis of hemostatic proteins confirmed by proteinase-inhibitor complexes determination, Z.Gastroenterol. (Band 28), Nr. 2, Seite 104-109.

[115] Gerhardt, R. E.; Ntoso, K. A.; Koethe, J. D.; Lodge, S. und Wolf, C. J. (1992): Acute plasma separation with hemodialysis equipment, J.Am.Soc.Nephrol. (Band 2), Nr. 9, Seite 1455-1458.

[116] Wegmuller, E.; Montandon, A.; Nydegger, U. und Descoeudres, C. (1986): Biocompatibility of different hemodialysis membranes: activation of complement and leukopenia, Int.J.Artif.Organs (Band 9), Nr. 2, Seite 85-92.

[117] LePage, E. B.; Lane, R.; McKay, D.; Rozga, J. und Demetriou, A. A. (1995): Plasma separation for artificial liver support, J.Clin.Apheresis. (Band 10), Nr. 2, Seite 70-75.

[118] Rehbinder, C.; Baneux, P.; Forbes, D.; van Herck, H.; Nicklas, W.; Rugaya, Z. und Winkler, G. (1998): FELASA recommendations for the health monitoring of breeding colonies and experimental units of cats, dogs and pigs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health, Lab.Anim. (Band 32), Nr. 1, Seite 1-17.

[119] Shibata, R.; Miura, T.; Hayami, M.; Ogawa, K.; Sakai, H.; Kiyomasu, T.; Ishimoto, A. und Adachi, A. (1990): Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) genome in relation to HIV-1 and simian immunodeficiency virus SIV (AGM), J.Virol. (Band 64), Nr. 2, Seite 742-747.

[120] Prusiner, S. B. (1994): Biology and genetics of prion diseases, Annu.Rev.Microbiol. (Band 48:655-86), Seite 655-686.

[121] Prusiner, S. B. (1997): Prion diseases and the BSE crisis, Science (Band 278), Nr. 5336, Seite 245-251.

[122] Bruce, M. E.; Will, R. G.; Ironside, J. W.; McConnell, I.; Drummond, D.; Suttie, A.; McCardle, L.; Chree, A.; Hope, J.; Birkett, C.; Cousens, S.; Fraser, H. und Bostock, C. J. (1997): Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments], Nature (Band 389), Nr. 6650, Seite 498-501.

[123] Tacke, S. J.; Kurth, R. und Denner, J.: Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?, Virology 2000.Mar.1.;268.(1.):87.-93. (Band 268), Nr. 1, Seite 87-93.

[124] Pitkin, Z. und Mullon, C. (1999): Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system, Artif.Organs (Band 23), Nr. 9, Seite 829-833.

[125] Paradis, K.; Langford, G.; Long, Z.; Heneine, W.; Sandstrom, P.; Switzer, W. M.; Chapman, L. E.; Lockey, C.; Onions, D. und Otto, E. (1999): Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue [see comments], Science (Band 285), Nr. 5431, Seite 1236-1241.

[126] Cooke, S. P.; Hederer, R. A.; Pearson, J. D. und Savage, C. O. (1995): Characterization of human IgG-binding xenoantigens expressed by porcine aortic endothelial cells, Transplantation (Band 60), Nr. 11, Seite 1274-1284.

[127] Fujioka, H.; Cramer, D. V.; Yasunaga, C.; Tuso, P. J.; Wu, G. D.; Middleton, Y.; Moscioni, A. D.; Rozga, J.; Demetriou, A. A. und Makowka, L. (1995): Differential patterns of reaction of human natural antibodies to pig hepatocytes and vascular endothelium, Liver Transpl.Surg. (Band 1), Nr. 2, Seite 85-93.

[128] Baquerizo, A.; Mhoyan, A.; Kearns-Jonker, M.; Arnaout, W. S.; Shackleton, C.; Busuttil, R. W.; Demetriou, A. A. und Cramer, D. V. (1999): Characterization of human xenoreactive antibodies in liver failure patients exposed to pig hepatocytes after bioartificial liver treatment: an ex vivo model of pig to human xenotransplantation, Transplantation (Band 67), Nr. 1, Seite 5-18.

[129] Bornemann, R.; Smith, M. D. und Gerlach, J. C. (1996): Consideration of potential immunological problems in the application of xenogenic hybrid liver support, Int.J.Artif.Organs (Band 19), Nr. 11, Seite 655-663.

[130] Hammer, C. und Molloy, B. (1993): Ethical aspects in xenotransplantation, Transplant.Proc. (Band 25), Nr. 4 Suppl 3, Seite 38-40.

[131] Daar, A. S. (1997): Ethics of xenotransplantation: animal issues, consent, and likely transformation of transplant ethics, World J.Surg. (Band 21), Nr. 9, Seite 975-982.

[132] Derenge, S. und Bartucci, M. R. (1999): Issues surrounding xenotransplantation, AORN.J. (Band 70), Nr. 3, Seite 428-432.

[133] Thomson, J. A. und Odorico, J. S.: Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines, Trends.Biotechnol.2000.Feb.;18.(2.):53.-7. (Band 18), Nr. 2, Seite 53-57.

[134] Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S. und Jones, J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [see comments] [published erratum appears in Science 1998 Dec 4;282(5395):1827], Science (Band 282), Nr. 5391, Seite 1145-1147.

[135] Gearhart, J. (1998): New potential for human embryonic stem cells [comment], Science (Band 282), Nr. 5391, Seite 1061-1062.

[136] Lenoir, N.: Europe confronts the embryonic stem cell research challenge, Science 2000.Feb.25.;287.(5457.):1425.-7. (Band 287), Nr. 5457, Seite 1425-1427.

[137] Branick, V. und Lysaught, M. T. (1999): Stem cell research: licit or complicit? Is a medical breakthrough based on embryonic and fetal tissue compatible with Catholic teaching?, Health Prog. (Band 80), Nr. 5, Seite 37-42.

[138] Young, F. E.: A time for restraint, Science 2000.Feb.25.;287.(5457.):1424. (Band 287), Nr. 5457, Seite 1424.

[139] Watanabe, F. D.; Mullon, C. J.; Hewitt, W. R.; Arkadopoulos, N.; Kahaku, E.; Eguchi, S.; Khalili, T.; Arnaout, W.; Shackleton, C. R.; Rozga, J.; Solomon, B. und Demetriou, A. A. (1997): Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial, Ann.Surg. (Band 225), Nr. 5, Seite 484-491.

[140] Liu, J.; Pan, J.; Naik, S.; Santangini, H.; Trenkler, D.; Thompson, N.; Rifai, A.; Chowdhury, J. R. und Jauregui, H. O. (1999): Characterization and evaluation of detoxification functions of a nontumorigenic immortalized porcine hepatocyte cell line (HepLiu), Cell Transplant. (Band 8), Nr. 3, Seite 219-232.

[141] Shi, Q.; Gaylor, J. D.; Cousins, R.; Plevris, J.; Hayes, P. C. und Grant, M. H. (1998): The effects of serum from patients with acute liver failure on the growth and metabolism of Hep G2 cells, Artif.Organs (Band 22), Nr. 12, Seite 1023-1030.

[142] Thomson, J. A. und Odorico, J. S.: Human embryonic stem cell and embryonic

germ cell lines, Trends.Biotechnol.2000.Feb.;18.(2.):53.-7. (Band 18), Nr. 2, Seite 53-57.

[143] Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S. und Jones, J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [see comments] [published erratum appears in Science 1998 Dec 4;282(5395):1827], Science (Band 282), Nr. 5391, Seite 1145-1147.

[144] Gearhart, J. (1998): New potential for human embryonic stem cells [comment], Science (Band 282), Nr. 5391, Seite 1061-1062.

[145] Kiassov, A. P.; Van Eyken, P.; van Pelt, J. F.; Depla, E.; Fevery, J.; Desmet, V. J. und Yap, S. H. (1995): Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study, Differentiation. (Band 59), Nr. 4, Seite 253-258.

[146] Fiorino, A. S.; Diehl, A. M.; Lin, H. Z.; Lemischka, I. R. und Reid, L. M. (1998): Maturation-dependent gene expression in a conditionally transformed liver progenitor cell line, In Vitro Cell Dev.Biol.Anim. (Band 34), Nr. 3, Seite 247-258.

[147] Brill, S.; Zvibel, I. und Reid, L. M. (1999): Expansion conditions for early hepatic progenitor cells from embryonal and neonatal rat livers, Dig.Dis.Sci. (Band 44), Nr. 2, Seite 364-371.

[148] Agelli, M.; Dello, Sbarba P.; Halay, E. D.; Faris, R. A.; Hixson, D. E. und Reid, L. M. (1997): Putative liver progenitor cells: conditions for long-term survival in culture, Histochem.J. (Band 29), Nr. 3, Seite 205-217.

[149] Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N.; Boggs, S. S.; Greenberger, J. S. und Goff, J. P. (1999): Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells, Science (Band 284), Nr. 5417, Seite 1168-1170.

[150] Petersen, B. E.; Goff, J. P.; Greenberger, J. S. und Michalopoulos, G. K. (1998): Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat, Hepatology (Band 27), Nr. 2, Seite 433-445.

[151] Shiota, G.; Kunisada, T.; Oyama, K.; Udagawa, A.; Nomi, T.; Tanaka, K.; Tsutsumi, A.; Isono, M.; Nakamura, T.; Hamada, H.; Sakatani, T.; Sell, S.; Sato, K.; Ito, H. und Kawasaki, H.: In vivo transfer of hepatocyte growth factor gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats, FEBS Lett.2000.Mar.31.;470.(3.):325.-30. (Band 470), Nr. 3, Seite 325-330.

[152] Hewitt, W. R.; Corno, V.; Eguchi, S.; Kamlot, A.; Middleton, Y.; Beeker, T.; Demetriou, A. A. und Rozga, J. (1997): Isolation of human hepatocytes from livers rejected for whole organ transplantation, Transplant.Proc. (Band 29), Nr. 4, Seite 1945-1947.

[153] Kardassis, D.; Busse, B.; Besseling, A.; Kraemer, M.; Puhl, G.; Spatkowski, G.; Holland, G.; Schnoy, N.; Mueller, C.; Neuhaus, P. und Gerlach, J. (1999): Enzyme release in hybrid liver support systems: marker for quality prior to clinical application, Transplant.Proc. (Band 31), Nr. 1-2, Seite 668-669.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACT	aktivierte Gerinnungszeit (activated clotting time)
AG	Aktiengesellschaft
ALT	Alanin-Aminotransferase
ALV	akutes Leberversagen
AS	Aminosäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Basenüberschuß (base excess)
BGA	Blutgaseanalyse
BM	Biomassse
BSE	bovine spongiform encephalopathy
(v)CJD	(various) Creutzfeldt-Jakob disease
Da.	Dalton
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung (disseminated intravascular coagulation)
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FFP	fresh frozen plasma
GABA	gammaaminobutteracid
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GLN	Glutamin
GLU	Glutamat
GLUT	Glucosetransporter
HAV	Hepatitis A Virus
Hb	Hämoglobin
HBV	Hepatitis B Virus

HGF	hepatic growth factor
HIV	human immunodeficiency virus
Hkt	Hämatokrit
hLUS	hybrides Leberunterstützungssystem
HOV	hepatic oval cell
I.E./I.U.	internationale Einheiten (international units)
Ig	Immunglobulin
KG	Körpergewicht
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LFT	Leberfunktionstest
LTx	Lebertranplantation
LUS	Leberunterstützungssystem
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NANB	Non-A Non-B
PAEC	porcine aortic endothelial cell
pCO_2	Kohlendioxidpartialdruck
PES	Polyethersulfon
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PPSB	Prothrombin + Prokonvertin + Stuart-Prower-Faktor + antihämophiles Globulin B
RNA	ribonucleic acid
SPF	specific pathogen free
SV	simian virus
Tab.	Tabelle
TIVA	totale intravenöse Anästhesie
TK	Thrombozytenkonzentrat
TSE	transmissible spongiform encephalopathy
V.	Vena

Lebenslauf

Name:	Adrian Phillip Mundt
Geburtsdatum:	05.11.1975
Geburtsort:	Heidelberg
Eltern:	Prof. Dr. med. Christoph Mundt
	Dr. med. Dörthe Mundt

Schulausbildung:

1982-1986	Landhausgrundschule, Heidelberg
1986/87	Kurfürst-Friedrich-Gymnasium, Heidelberg
1987-1989	Ernst-Mach-Gymnasium, München
1989-1992	Kurfürst-Friedrich-Gymnasium, Heidelberg
1992/93	Pocatello High School, Pocatello, Idaho, USA
1993-1995	Kurfürst-Friedrich-Gymnasium, Heidelberg

Universitätsausbildung:

1995-1997	Freie-Universität Berlin
1997/98	Humboldt Universität zu Berlin
1998/1999	Erasmus Stipendium an der Université de Lausanne, Schweiz
1999/2000	Humboldt Universität zu Berlin
2000/2001	Stipendium für wissenschaftliche und klinische Praktika am Department of Endocrinology and Metabolism des Beth Israel Deaconess Medical Center und der Harvard Medical School, Boston, USA
ab Okt 2001	Humboldt Universität zu Berlin

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus für die Überlassung des Themas und die Unterstützung der Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie. Ich danke Herrn PD Dr. Jörg Gerlach für die Leitung des Projekts, das er mit bewundernswerter Energie und Kreativität ins Leben rief und bis zur klinischen Anwendung weiterentwickelte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Benedikt Busse, der mit Anregungen, Kritik und wissenschaftlichen Diskussionen die Arbeit betreute. Ich danke Herrn Dimitrios Kardassis für die Betreuung und das Heranführen an die praktische, wissenschaftliche Arbeit. Ich danke Herrn Dr. Mark Smith für Diskussionen und Überlegungen zu mathematisch-physikalischen Modellen. Mein Dank gilt Frau Dipl. Ing. Nicole Obermeyer und Herrn Dr. Markus Krämer für Anregungen und Unterstützung. Ich danke ganz besonders meinen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden Richard Doll, Christina Fotopoulou, Gereon Gäbelein, Winfried Höhn, Raphael Hofbauer und Rainer Richard für freundschaftliche Unterstützung, Teamgeist und Motivation in Zeiten der Rückschläge. Herrn Philippe Huguenin und Beatriz Porcar, danke ich für mathematisch-physikalische Überlegungen. Ich danke Frau Dr. Katrin Zeilinger, Frau Dr. Gabriele Spatkowski, Herrn Dipl. Ing. Stephan Auth, Frau Patricia Burkhardt und Frau Ines Puschendorf für ihre Unterstützung.

Meine Eltern unterstützten mich in jeder Hinsicht emotional, inhaltlich und finanziell.

Erklärung an Eides Statt

Die Dissertation wurde von mir selbst ohne (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Benutzte Hilfsmittel sowie Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 26. October 2001 Adrian Mundt