

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für
Gastroenterologie und Hepatologie

**Virusinfektionen als Auslöser eines
Akut-auf-chronischen Leberversagens**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Janina Anuschka Hammig
aus Mettingen
2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub

universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/81249

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240229-075900-8



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC BY 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter/in: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Ch. Lange
2. Gutachter/in: Herr Priv.-Doz. Dr. med. A Katsounas

Tag der mündlichen Prüfung: 18. September 2023

1 INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|--|-----------|
| 1 INHALTSVERZEICHNIS | 3 |
| 1 EINLEITUNG..... | 6 |
| 1.1 Das Akut-auf-chronische Leberversagen | 6 |
| 1.1.1 Definition und Scoring | 6 |
| 1.1.2 Epidemiologie, klinischer Verlauf, Therapie | 12 |
| 1.2 Immunpathophysiologie des ACLV | 13 |
| 1.3 Virusinfektionen im Kontext chronischer Lebererkrankungen..... | 15 |
| 2 FRAGESTELLUNG..... | 18 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 3.1 Studiendesign..... | 19 |
| 3.2 Untersuchungskollektiv und Einschlusskriterien | 21 |
| 3.3 Klinische Datenerhebung und Biobanking..... | 22 |
| 3.4 Probenakquirierung und -verarbeitung..... | 23 |
| 3.4.1 Aszites | 23 |
| 3.4.2 Blutserum..... | 25 |
| 3.5 Proteinbiomarker: Erstellung von Immunoassays..... | 25 |
| 3.6 Statistik, Literaturrecherche und Textverarbeitung..... | 30 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.7 | Ethikvotum | 31 |
| 4 | ERGEBNISSE | 32 |
| 4.1 | Patient:innencharakteristika..... | 32 |
| 4.2 | Virale DNA im Aszites..... | 36 |
| 4.3 | Vergleich immunologischer Profile..... | 38 |
| 4.3.1 | Signalproteine und Enzyme..... | 39 |
| 4.3.2 | Wachstumsfaktoren | 42 |
| 4.3.3 | Zytokine..... | 45 |
| 4.3.4 | Immunologische Rezeptoren | 49 |
| 4.3.5 | Chemokine..... | 52 |
| 4.4 | Charakterisierung von Aszites und Serum als Kompartimente..... | 54 |
| 4.4.1 | Das immunologische Profil von Serum und Aszites | 55 |
| 4.4.2 | Das immunologische Aszitesprofil..... | 56 |
| 4.4.3 | Das immunologische Serumprofil..... | 58 |
| 4.5 | Klinische Endpunkte..... | 59 |
| 5 | DISKUSSION | 63 |
| 5.1 | Hauptergebnisse..... | 63 |
| 5.2 | Methodendiskussion | 64 |
| 5.3 | Ergebnisdiskussion | 66 |
| 5.3.1 | Virale Aszitesinfektionen bei Leberzirrhose | 66 |
| 5.3.2 | Immunologische Kompartimente | 69 |
| 5.3.3 | Viral getriggerte Immunreaktionen und klinische Endpunkte | 71 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.4 Zusammenfassung | 74 |
| 5.4 Limitationen und Ausblick | 75 |
| 6 ZUSAMMENFASSUNG | 77 |
| 7 LITERATURVERZEICHNIS | 79 |
| 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 87 |
| 9 TABELLENVERZEICHNIS | 88 |
| 10 TABELLARISCHER UND GRAFISCHER ANHANG | 89 |
| 11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 96 |
| 12 DANKSAGUNG | 98 |
| 13 LEBENS LAUF | 99 |

1 EINLEITUNG

1.1 Das Akut-auf-chronische Leberversagen

Das ACLV beschreibt ein klinisches Syndrom als spezifische, aber komplex-multifaktorielle Form der hepatischen Dekompensation chronischer Lebererkrankungen mit einem sich rasch entwickelnden hepatischem oder extrahepatischem Organversagen und einer hohen Kurzzeitmortalität. Je nach geografischer Region existieren heterogene Definitionen. Während westliche Länder sich auf Patient:innen mit einem zirrhotischen Leberumbau beziehen, umfasst das ACLV in Asien auch die Exazerbation chronischer Lebererkrankungen ohne Leberzirrhose. Gemein haben alle Konsortien, dass dem ACLV eine massive lokale und systemische Inflammation zugrunde liegt. Das ACLV ist eine klinische Entität, die zwar potenziell reversibel ist, grundsätzlich allerdings einen lebensbedrohlichen klinischen Zustand darstellt (Moreau et al., 2021; Zaccherini et al., 2021).

Hiervon abgegrenzt wird die akute Dekompensation (AD) ohne Organversagen, die sich durch ein einzelnes oder kombiniertes Auftreten von Aszites, einer hepatischen Enzephalopathie (HE), gastrointestinaler Hämorrhagie und/oder bakteriellen Infektion definiert.

1.1.1 Definition und Scoring

Vier große internationale Konsortien haben sich unter den heterogenen Definitionen eines ACLV durchgesetzt:

Initial veröffentlichte die Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) im Jahre 2009 das ACLF Research Consortium (AARC) als erste publizierte Definition eines ACLV.

Die European Association for the Study of the Liver - Chronic Liver Failure (EASL-CLIF) setzte ihre europaweit angewandte Definition des ACLV vier Jahre später auf Basis der eigens zu diesem Zweck durchgeführten CANONIC- Studie 2013 durch (Moreau et al., 2021).

Das North American Consortium for the Study of End-stage Liver Disease (NACSELD) bezieht in Nordamerika 4 Organsysteme in die Klassifikation eines ACLV mit ein.

Mit der Chinese Group on the Study of Severe Hepatitis B (COSSH) existiert für ein HBV-spezifisches Konsortium, welches zu großen Teilen den CLIF-C-OF Score und die Kriterien der EASL-CLIF für ihr Scoring heranzieht (Moreau et al., 2021).

Vergleichende Studien schreiben der EASL-CLIF Definition eine höhere Sensitivität und genauere Prognose im Vergleich zur AARC und NACSELD zu (Arroyo et al., 2016; Li and Thuluvath, 2021).

Die EASL-CLIF Definition beruht im Gegensatz zum AARC auf 6 statt 4 Organsystemen und bezieht extrahepatische Ereignisse wie bakterielle Infektionen und Varizenblutungen in die Pathogene eines ACLV als Trigger mit ein, statt sie wie die AARC als Komplikationen zu werten (Arroyo et al., 2016).

Diese Arbeit liegt im Folgenden ausschließlich der EASL-CLIF Richtlinien für chronische Lebererkrankungen und ihrer entsprechenden Scorings zum Differenzieren des Erkrankungsstadiums zugrunde:

1. CLIF-C-OF-Score (Chronic Liver Failure- Consortium- Organ Failure- Score),
2. CLIF-C-AD (Chronic Liver Failure- Consortium- Acute Decompensation),
3. CLIF-C-ACLF-Score (Chronic Liver Failure- Consortium- Acute-on-Chronic Liver Failure- Score)



Abbildung 1.1: Diagnostik einer AD und eines ACLV

Grundlage des CLIF-C-OF Scores ist der CLIF-SOFA Score, der im Rahmen der CANONIC-Studie von Moreau et. al aus dem Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score mit spezifischem Bezug auf die Kriterien eines ACLV zu dessen Definition weiterentwickelt wurde. Der CLIF-SOFA Score unterscheidet sich vom ursprünglichen

SOFA-Score durch die Verwendung der International Normalized Ratio (INR) anstatt der Thrombozytenzahl zur Bestimmung der Blutgerinnung sowie die der West-Haven-Kriterien für eine hepatische Enzephalopathie anstatt der Glasgow Coma Scale (GCS) als Grundlage für die neurologische Einschätzung.

Er erwies sich dem Model of End-Stage Liver Disease (MELD) Score gegenüber gleichwertig, sowie als präziser als der Child-Pugh Score in Bezug auf die Prognose der 28-Tage Mortalität. Anhand ihrer Funktion werden die 6 Organsysteme Leber, Niere, Gehirn, Blutgerinnung und -Kreislauf sowie Lunge einem Einzelscore zugewiesen, die sich zu einem Gesamtscore mit einer Punktzahl von minimal 0 bis maximal 24 akkumuliert (Moreau et al., 2013).

Tabelle 1.1: CLIF-SOFA Score nach (Moreau et al., 2013).

| System/Organ | 0 Punkte | 1 Punkt | 2 Punkte | 3 Punkte | 4 Punkte |
|---|----------|--------------------------------|---|---|--|
| Leber (Bilirubin in mg/dl) | < 1,2 | 1,2 bis < 2,0 | 2,0 bis < 6,0 | 6,0 bis < 12,0 | ≥ 12,0 |
| Niere (Kreatinin in mg/dl) | < 1,2 | 1,2 bis < 2,0 | 2,0 bis < 3,5 | 3,5 bis < 5,0 | ≥ 5,0 <i>oder</i> Dialyse |
| Gehirn (HE in Grad nach West-Haven) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Blutgerinnung (INR) | < 1,1 | 1,1 bis < 1,25 | 1,25 bis < 1,5 | 1,5 bis < 2,5 | ≥ 2,5 <i>oder</i> Thrombozyten < 20 x 10⁹/L |
| Blutkreislauf (MAD, mmHg) | ≥ 70 | < 70 | Dopamin ≤ 5 <i>oder</i> Dobutamin <i>oder</i> Terlipressin | Dopamin > 5 <i>oder</i> Epinephrin ≤ 0,1 <i>oder</i> Noradrenalin ≤ 0,1 | Dopamin > 15 <i>oder</i> Epinephrin > 0,1 <i>oder</i> Noradrenalin > 0,1 |
| Lunge (PaO ₂ /FiO ₂ <i>Oder</i> SpO ₂ /Fi O ₂) | > 400 | > 300 und ≤ 400 | > 200 und ≤ 300 | > 100 und ≤ 200 | ≤ 100 |
| | > 512 | ≤ 400 > 357 und ≤ 512 | > 214 und ≤ 357 | > 89 und ≤ 214 | ≤ 89 |

Jalan et. al entwickelte aus dem CLIF-SOFA Score im Jahr 2014 den vereinfachten CLIF-C-OF Score. Die Organfunktion wird dabei mit vereinfachten Einzelscores bewertet,

woraus sich ein Punktesystem von 6 bis 18 ergibt. Beide Scores und ihre Unterschiede können der Tabelle 1.1 und Tabelle 1.2 entnommen werden (Jalan et al., 2015).

Tabelle 1.2: Der CLIF-C-OF Score

| Organsystem | Score= 1 | Score= 2 | Score= 3 |
|---|----------------|------------------------------------|------------------------------|
| Leber (Bilirubin in mg/dl) | <6 | 6 bis ≤12 | >12 |
| Niere (Kreatinin in mg/dl) | <2 | 2 bis <3,5 | ≥3,5 oder Dialyse |
| Gehirn (HE, Grad, nach West-Haven) | 0 | 1-2 | 3-4 |
| Blutgerinnung (INR) | <2 | 2 bis <2,5 | ≥2,5 |
| Blutkreislauf (MAD, mmHg) | ≥70 | <70 | Vasopressoren |
| Lunge (PaO ₂ /FiO ₂ oder SpO ₂ /Fi O ₂) | > 300 > 357 | ≤ 300 und > 200 ≤ 357 und > 214 | ≤ 200 ≤ 214 |

Der CLIF-C-OF Score wird für die Definition einer AD und eines ACLV verwendet. Er erwies sich bei ACLV-Patient:innen prognostisch überlegen in Bezug auf die 28-Tage-Mortalität im Vergleich zum MELD-Score (Jalan et al., 2015; Moreau et al., 2013).

Für die Einteilung eines ACLV nach Schweregraden wird folgendes Grading durch die European Foundation for the study of chronic liver failer (EF CLIF) vorgegeben (vgl. Tabelle 1.3):

Tabelle 1.3: ACLV Grading nach der EF CLIF.

| ACLV | Kriterien |
|--|--|
| Akute Dekompensation/ Kein ACLV | <ol style="list-style-type: none"> Kein Organversagen <i>oder</i> Ein Organversagen (Leber, Gerinnung, Kreislauf, Lunge) ohne Nieren-/oder Hirnbeteiligung (Kreatinin <1,5mg/dl, keine HE) <i>oder</i> Isolierte HE mit Kreatinin <1,5mg/dl |
| ACLV Grad I | <ol style="list-style-type: none"> Isoliertes akutes Nierenversagen <i>oder</i> |

| | |
|----------------------|--|
| | 2. Jegliches Organversagen + Nierenversagen (Kreatinin 1,5- 1,9mg/dl) und/oder HE Grad I-II <i>oder</i> |
| | 3. HE Grad III-IV + Nierenversagen (Kreatinin 1,5- 1,9mg/dl) |
| ACLV Grad II | zwei Organversagen |
| ACLV Grad III | ≥ 3 Organversagen |

Nach Berechnung des CLIF-C-OF Scores kann zwischen einer AD und einem ACLV differenziert werden und zur prognostischen Erfassung der Mortalität der CLIF-C-AD Score bzw. der CLIF-C-ACLV Score berechnet werden (Jalan et al., 2015).

Nach dem EASL-CLIF Konsortium wird eine AD als ein fehlendes oder ein singuläres Organversagen von einem ACLV abgegrenzt, wobei das singuläre Organversagen kein Nieren- oder Gehirnversagen sein darf (Moreau et al., 2013).

Bei Patient:innen mit AD haben sich als prognostische Faktoren das Alter und Serumnatrrium, sowie die Leukozytenanzahl, Kreatininkonzentration und der INR bewiesen. Der sich hieraus ergebende Score ist der CLIF-C-AD Score mit der Formel: $CLIF-C-AD = 10 \times [0,03 \times \text{Alter} + 0,66 \times \ln(\text{Kreatinin in mg/dl}) + 1,71 \times \ln(\text{INR}) + 0,88 \times \ln(\text{Leukozytenanzahl} - 0,05 \times (\text{Serumnatrium in mmol/L}) + 8]$.

Liegt nach Berechnung des CLIF-C-OF Score ein ACLV vor, kann durch die Ergänzung des Alters und der Leukozytenkonzentration der CLIF-C-ACLF Score wie folgt errechnet werden: $CLIF-C-ACLF = 10 \times [0,33 \times CLIF-OF + 0,04 \times \text{Alter} + 0,63 \times \ln(\text{Leukozytenanzahl}) - 2]$.

Mit dem Child-Pugh Score und dem Model-of-End-Stage-Disease (MELD) gibt es zwei weitere akzeptierte Evaluationssysteme für das therapeutische Verfahren mit einer chronischen Lebererkrankung.

Der Child-Pugh Score (vgl. Tabelle 1.4) ermittelt die Prognose von Patient:innen mit Leberzirrhose. Initial entwickelt für die Indikationsstellung einer operativen Pfortaderdekompression wurde das von Child und Turcotte entwickelte Scoring durch Pugh et al. zu dem heute gültigen Modell weiterentwickelt (Tsois and Marlar, 2022).

Tabelle 1.4: Der Child-Pugh-Score nach (Pugh et al., 1973) zur Evaluation der Organfunktion und Mortalitätsprognose bei Leberzirrhose

| Kriterium | 1 | 2 | 3 |
|--|--------------|-----------------------|----------------|
| Serumbilirubin (gesamt) in $\frac{mg}{dl}$ | <2,0 | 2,0 – 3,0 | >3,0 |
| Serumalbumin in $\frac{mg}{dl}$ | >3,5 | 2,8 – 3,5 | <2,8 |
| Quick in %/ INR | >70/ <1,7 | 40 – 70/ 1,7 – 2,2 | <40/ >2,2 |
| Aszites (sonografisch detektiert) | Keiner | Leichtgradig | Mittelgradig |
| Grad der hepatischen Enzephalopathie | keine | Stadium I-II | Stadium III-IV |

Das Punktesystem und deren Einordnung in Klassen zur Bestimmung der Leberfunktion und Einschätzung der Mortalität gestaltet sich nach den Stadien A-C (Cholongitas et al., 2005):

- Stadium A: 5 bis 6 Punkte, entsprechend einer guten Leberfunktion und einer 1-Jahres-Überlebensrate von 100%.
- Stadium B: 7 bis 9 Punkte, entsprechend einer mäßigen Leberfunktion und einer 1-Jahres-Überlebensrate von 80%.
- Stadium C: 10 bis 15 Punkte, entsprechend einer geringen Leberfunktion und einer 1-Jahres-Überlebensrate von ca. 45%.

Auch der MELD-Score dient als Index zur Bestimmung des Krankheitsstadiums und wird mithilfe der Laborparameter Bilirubin, INR und Kreatinin bestimmt und errechnet sich folgendermaßen (Kamath et al., 2001):

$$\text{MELD} = 3,78 \times \ln(\text{Bilirubin in mg/dl}) + 11,2 \times \ln(\text{INR}) + 9,57 \times \ln(\text{Kreatinin in mg/dl}) + 6,43.$$

Im Falle einer Dialylenotwendigkeit innerhalb der letzten 7 Tage wird der Kreatininwert dem Wert 4,0 mg/dl gleichgesetzt.

Ursprünglich eingeführt zur Indikationsstellung von TIPS-Anlagen, wurde der MELD-Score 2003 von Eurotransplant übernommen, um die Dringlichkeit und Prognose einer Lebertransplantation von Patient:innen im Endstadium ihrer chronischen Lebererkrankung zu evaluieren (Wiesner et al., 2003).

1.1.2 Epidemiologie, klinischer Verlauf, Therapie

Die Prävalenz der Leberzirrhose nimmt zu und bedingt weltweit die 11. häufigste Todesursache (Asrani et al., 2019), in Mitteleuropa sogar die vierthäufigste. Abhängig von ihren verschiedenen klinischen Prognosestadien liegt die 1-Jahres Mortalität bei 1 bis 57% (Tsochatzis et al., 2014).

Die Prävalenz des ACLV als Stadium einer lebensbedrohlichen klinischen Exazerbation der chronischen Erkrankung beträgt unter Risikopopulationen 20-35% (Arroyo et al., 2016).

Die Sterblichkeit korreliert eng mit dem CLIF-C-OF Score bzw. der Anzahl der Organausfälle und liegt nach EASL-CLIF Konsortium weltweit zwischen 30 bis 50%. Ohne Lebertransplantation beträgt die 28-Tage-Mortalität in Europa 1,9% für Patient:innen mit AD und 32,8% für Patient:innen mit ACLF (Arroyo and Jalan, 2016).

Der Grad des Leberversagens ist entscheidend für die Prognose, wie die CANONIC-Studie mit Zahlen von 23% Mortalität bei Grad 1 ACLV über 31% bei Grad 2 hin zu 74% bei Grad 3 zeigt (Moreau et al., 2021). Ein Drittel der Patient:innen mit AD weisen bei Krankenhauseinweisung ein ACLV auf oder entwickeln das Syndrom im Verlauf (Arroyo et al., 2016).

Der Krankheitsgipfel ist in über 80% der Patient:innen nach einer Woche erreicht, weshalb die Prognosestellung an Tag 3-7 die größte Aussagekraft besitzt. Abhängig vom Schweregrad des ACLV gelingt eine erfolgreiche konservative Therapie bei nur 16-53,5% der Betroffenen. Aufgrund des komplexen und hoch variablen Krankheitsbildes existiert keine spezifische ACLV-Therapie, sondern die Behandlung besteht vorrangig aus einer Standardtherapie der jeweilig vorliegenden Organversagen, ihrer Trigger und Komplikationen (Gustot et al., 2015). Wichtig ist deshalb die frühzeitige Erkennung der auslösenden Faktoren und ein multidisziplinärer Ansatz mit dem gezielten Einsatz einer kalkulierten antiinfektiven Therapie, Nukleosidanaloga bei HBV-ACLV, Steroiden bei alkoholtoxischer Hepatitis und autoimmuner Genese sowie der Einsatz von Überbrückungstherapien (Sarin and Choudhury, 2016).

Ein operatives Vorgehen mit einer Lebertransplantation erhöht das 1-Jahres-Überleben von unter 10 % auf über 80 % (Artru et al., 2017).

Leider liegen gegen eine Transplantation häufig schon mit dem Auftreten eines ACLV Kontraindikationen vor, beispielsweise in Form von Infektionen oder Alkoholkonsum (Hernaez et al., 2017). Für diese Patient:innen ist eine Therapielimitierung spätestens mit einem CLIF-C-ACLF-Score über 64 sinnvoll, die laut CANONIC-Studie eine hundertprozentige 90-Tags-Mortalität prognostizieren (Gustot et al., 2015).

Die Unterstützung der Regenerationsfähigkeit, die zellbasierte Therapie, die Immuntherapie und die Modulation der Darmmikrobiota sind neue therapeutische Ansätze für die spezifische Behandlung eines ACLV, die weiterer Forschung bedürfen (Sarin and Choudhury, 2016).

1.2 Immunpathophysiologie des ACLV

Schon die Entwicklung einer Leberzirrhose steht in Zusammenhang mit einem aktivierten Immunsystem, welches zunächst an einer lokalen hepatischen Inflammation beteiligt ist und später zu einer systemischen Immunreaktion führt.

Eine Leberfibrose und -zirrhose entsteht durch eine akute oder chronische Entzündung der Leber als immunpathologische Wundheilungsreaktion auf die vorhandene Zellschädigung durch heterogene Stressoren wie beispielsweise Noxen (Alkohol, Medikamente), Infektionen, Autoimmunreaktionen und Stoffwechselstress. Der Leberverletzung wird die Aktivierung von hepatischen Stellatzellen zur Ausbildung einer extrazellulären Matrix mit Narbenbildung und einer Neoangiogenese entgegengesetzt. Außerdem werden lokale Immunzellen, beispielsweise Makrophagen, aktiviert (Pellicoro et al., 2014).

Der lokalen folgt eine systemische Entzündungsreaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit einer fortschreitenden portalen Hypertension, oxidativem Stress und dem Absterben parenchymatöser und nicht-parenchymatöser Leberzellen. Immunzellen wie Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden freigesetzt und körpereigene Entzündungsmediatoren wie DAMPs (Damage associated molecular Patterns) ausgeschüttet (Albillos et al., 2014).

Der zirrhotische Leberumbau wird also nicht nur durch ein zunehmend dysreguliertes Immunsystem gefördert, sondern die Leberzirrhose katalysiert wiederum eine weitere inflammatorische Exazerbation. Die Folge dieses inflammatorischen Upcyclings zeigt sich in einem klinischen Vollbild einer Leberzirrhose durch portale Hypertension, epitheliale

Leckage, Gewebhypoxie in Darm, Leber und Nieren sowie intestinale Dysbiose mit bakterieller Translokation; ihrerseits neue inflammatorische Impulse durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) generierend. Insbesondere die Expression proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF- α), Interferon (IFN-gamma) und Interleukin (IL-1) gehen mit einer fortschreitenden Leberzirrhose einher (Giannelli et al., 2014; Lange and Moreau, 2018).

Der Progress einer Leberzirrhose in kompensiertem Stadium zu einem ACLV entsteht entweder als akute Verschlechterung der bestehenden Leberfunktion, häufiger aber durch ein auslösendes Ereignis. Die darauffolgende überschießende Immunreaktion ist eine systemische inflammatorische Antwort (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) mit einem massiven proinflammatorischen Sturm, dessen häufigste Auslöser bakterielle Infektionen und Alkohol darstellen (Hernaes et al., 2017; Lange and Moreau, 2018).

Klinisch spiegelt sich die systemische Entzündung in der Leukozytenkonzentration und dem C-reaktiven Protein (CRP), sowie in der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL1 beta, IL-6, IL-8 (Clària et al., 2016a; Hernaes et al., 2017).

Auch andere Zytokine (IFN- α , IL-17A, IL-7) werden mit Dekompensation einer Zirrhose höher exprimiert, ohne dass jedoch ein weiterer Anstieg dieser Parameter bei einem ACLV festgestellt wurde (Clària et al., 2016a).

In der Spätphase des ACLV entsteht reaktiv auf das SIRS ein kompensatorisches antiinflammatorisches Response-Syndrom (CARS), bestehend aus der Produktion immunregulatorischer Zellpopulationen, entzündungshemmender Zytokine (IL-10 und IL-1RA), Tyrosin-Protein-Kinase Mer und Immun-Checkpoints. Diese Immunparalyse zielt darauf ab, die unkontrollierte systemische Entzündung und deren Kollateralschäden zu begrenzen beziehungsweise zu reparieren. Mit ihr einher geht jedoch auch eine höhere Infektanfälligkeit, weshalb Infektionen nicht nur zu den häufigsten Auslösern gehören, sondern es sie auch zu Komplikationen eines ACLV macht und die Dysbalance der Immunreaktion weiter exazerbiert (Clària et al., 2016b; Lange and Moreau, 2018).

Auslösende Ereignisse für die systemische Inflammationskaskade eines ACLV variieren weltweit mit ihrer geografischen Prävalenz. In Asien sind hepatotrope Virusinfektionen wie die Reaktivierung einer chronischen Hepatitis B, eine akute Infektion mit dem

Hepatitis A Virus (HAV) oder Hepatitis E Virus (HEV) sowie auch Alkoholabusus oder bakterielle Infektionen die häufigsten Auslöser.

In Europa begründet sich das ACLV in 37,3% der Patient:innen allein durch Alkoholmissbrauch und bakterielle Infektionen. Zu Beginn der CANONIC-Studie hatten 9,8 % eine spontan bakterielle Peritonitis (SBP), 6% eine Harnwegsinfektion, 7,7% eine Pneumonie und 2,9% eine Haut- und Weichteilinfektionen. Candida-Infektionen traten in 3,9 % der Fälle auf (Arroyo et al., 2016; Moreau et al., 2013).

Claria et. al stärkte in einer großen Studie mit 562 Patient:innen im Jahr 2016 die Bedeutung der systemischen Inflammation als primäre Ursache für ein ACLV. Ferner charakterisierte die Studie eine Trigger-abhängige, individuelle Immunpathogenese des ACLV, indem sie unterschiedliche Zytokinprofile in Abhängigkeit von ihrem auslösenden Ereignis beschrieb: Mit einer bakteriellen Infektion wurden signifikant höhere TNFa-, IL-6- und IL-1RA-Werte gemessen als in ACLV anderer Genese, während bei Alkoholismus hohe IL-8-Werte charakteristisch waren (Claria et al 2016).

Letztlich bleiben aber über 40% der Patient:innen ohne benennbaren akuten Insult vor der Entwicklung eines ACLV. Zudem werden auch weniger häufige Trigger noch nicht hinreichend verstanden, beispielsweise das medikamentös ausgelöste Leberversagen (drug-induced liver failure, DILI) oder die Rolle viraler Infektionen jenseits der bekannten hepatotropen Virusinfektionen A-E. Hier besteht weiterhin hoher Forschungsbedarf, um die Pathogenese des lebensbedrohlichen Syndroms noch besser zu verstehen und prophylaktische sowie therapeutische Behandlungsansätze weiter voranzutreiben.

1.3 Virusinfektionen im Kontext chronischer Lebererkrankungen

Viren als Trigger einer hepatischen Dekompensation oder gar eines Leberversagens bei Patient:innen mit chronischer Lebererkrankung sind im Rahmen der hepatotropen Virusinfektionen A-E bekannt. Dabei ist der akute und chronische Verlauf der Virushepatitiden in der aktuellen Literatur ausführlich beschrieben.

Die klinische Relevanz nicht-hepatotroper Virusinfektionen für chronische Lebererkrankungen ist bisher allerdings nur unzureichend erforscht. Große Studien beziehen sich hauptsächlich auf akute Infektionsereignisse mit selbstlimitierenden Verläufen oder seltenen, schwerwiegenden Komplikationen wie dem des akuten Leberversagens (ALV).

Eine besondere Rolle spielen opportunistische Virusinfektionen auch in der Behandlung von immunsupprimierten Patient:innen nach Lebertransplantation.

In diesem Kontext sind virale Erreger mit hohen Durchseuchungsraten wie denen des humanen Cytomegalievirus (hCMV) und des Epstein-Barr Virus (EBV) bereits Gegenstand der hepatologischen Forschung. Sie gehen mit zahlreichen Lebermanifestationen einher und können asymptomatisch sein, aber auch ikterisch selbstlimitierend verlaufen oder bis hin zu einem ALV führen. hCMV-Infektionen werden mit einem erhöhten HCC-Risiko assoziiert und bei immunsupprimierten Menschen, insbesondere nach Lebertransplantation (LTX), ist die Virusinfektion die häufigste infektiöse Komplikation mit einer erheblichen Morbidität. EBV ist währenddessen Hauptursache für posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankungen (Bunchorntavakul and Reddy, 2020).

Andere virale Erreger wie das humane Adenovirus (hADV) oder das Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1) sind noch seltener beschrieben und beziehen sich ebenfalls auf akute Ereignisse:

Die HSV-Hepatitis ist eine seltene Komplikation, die laut eines umfangreichen Reviews der bestehenden Literatur nur 2% aller viral assoziierten Leberversagen ausmacht und als akutes Organversagen immunsupprimierter Menschen auftritt (Then et al., 2019).

Eine kleine retrospektive Studie zur Influenzainfektion beobachtete bereits 2015 bei jungen Männern mit Leberzirrhose ein dreifach erhöhtes Risiko für einen exazerbierten respiratorischen Verlauf (van Kerkhove et al., 2015).

Große wissenschaftliche Aufmerksamkeit wurde einem weiteren respiratorischen Virus im Rahmen der Corona-Pandemie seit 2020 zuteil, als das Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Gegenstand der Forschung und als Risikofaktor für eine Exazerbation chronischer Lebererkrankungen, respektive als Trigger eines ACLV beschrieben wurde. Das Virus führte bei Patient:innen mit Zirrhose zu einem signifikanten Anstieg von Bilirubin, Prothrombinzeit und Kreatinin. Parallel nahm die Albuminkonzentration signifikant ab und der MELD-Score stieg signifikant (Iavarone et al., 2020).

Moon et al. berichten aus ihrer Studienkohorte über eine Quote von 25% (39 von 152) neuer Dekompensationsereignisse nach einer COVID-19 Diagnose und 24 dieser Patient:innen starben (Moon et al., 2020). Auch in einer indischen Studie mit 57 Leberzirrhose Patient:innen mit COVID-19-Koinfektion wiesen 35 % ein ACLV auf. Die ACLV-

Gruppe hatte einen signifikant verlängerten Krankenhausaufenthalt, mehr intensivstationäre Aufenthalte und eine höhere Sterblichkeit (30 % gegenüber 5 %) (Choudhary et al., 2021). Patient:innen mit Leberzirrhose wiesen nach einem schweren SARS-CoV-2 Verlauf eine deutlich höhere Sterblichkeit von über 30% auf und eine hepatische Dekompensation zu Beginn der Erkrankung stellte einen unabhängigen Prädiktor für die Gesamtmortalität dar (Limon-De La Rosa et al., 2022). Das Coronavirus wirkt einerseits über den ACE-2-Rezeptor, andererseits wurde auch eine starke Immunreaktion mit dem für das ACLV typischen Zytokinsturm nachgewiesen, die in fast 50 % der Patient:innen zu einer massiven Leberfunktionsstörung führten (Elhence et al., 2021).

Die angeborene Immunantwort auf mikrobielle Krankheitserreger ist die erste Verteidigungslinie einer schützenden Immunität. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Bakterien hauptsächlich durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), die auf der Zelloberfläche und in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten vorhanden sind. Zu den PRRs gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die Retinsäure-induzierbaren Gen-I-ähnlichen Rezeptoren (RLRs), die Nukleotid-Oligomerisierungsdomänen-ähnlichen Rezeptoren (NLRs) und zytosolische DNA-Sensoren (Mogensen, 2009). Derselbe Mechanismus greift auch mit viralen Sensor-PRRs in verschiedenen zellulären Kompartimenten, die ein breites Spektrum von Viren identifizieren können, um auf sie zu reagieren. Virale Proteine können der Auslöser dieser Rezeptoren sein, hauptsächlich jedoch sind Nukleinsäuren die viralen Aktivatoren. Bakterien, Viren oder Pilze werden durch verschiedene PRRs erkannt und lösen eine komplexe Signalkaskade aus, an deren Ende die immunpathologische Produktion von Interferonen und Zytokinen als Entzündungsreaktion auf die Erreger steht (Mogensen, 2009). Die antivirale Immunantwort lässt vermuten, dass eben dieser immunmodulatorische Effekt auch in der Pathogenese chronischer Lebererkrankungen eine Rolle spielt.

Das Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Ausschuss des US-amerikanischen Zentrums für Krankheitskontrolle und -prävention, empfiehlt Menschen mit chronischen Lebererkrankungen eine Impfung gegen das HAV, HBV, Influenza, Pneumokokken, Herpes zoster und SARS-CoV-2. Mit zunehmender Erkrankung nimmt die Wirksamkeit der Impfstoffe ab, weshalb sie idealerweise früh im Krankheitsverlauf verabreicht werden sollten, um eine optimale Immunantwort zu erzielen (Alukal et al., 2022).

2 FRAGESTELLUNG

Die Pathogenese des akut-auf-chronischen Leberversagens (ACLV), das als eine schwerwiegende Exazerbation der dekompensierten Leberzirrhose mit einer hohen Mortalität einhergeht, ist bisher noch unzureichend erforscht. Die auslösenden Mechanismen dieser gefürchteten Komplikation bleiben in über 40% der Fälle unerkannt.

Insbesondere die spontan bakterielle Peritonitis als Trigger eines ACLV ist bereits vielfach beschrieben und ihr Ausschluss in die leitliniengerechte Routinediagnostik jeder Leberfunktionsverschlechterung integriert.

Die virologische Diagnostik chronischer Lebererkrankungen beschränkt sich oft auf die hepatotropen Virusinfektionen Hepatitis A-E.

Ziel der Dissertation war es deshalb, die Relevanz von nicht-hepatotropen Virusinfektionen in der Pathogenese eines ACLV zu untersuchen und deren Einfluss auf lokale und systemische immunologische Prozesse im Kontext chronischer Lebererkrankungen zu charakterisieren.

Die primäre Arbeitshypothese benennt (nicht-hepatotrope) Viren als potenzielle Trigger eines ACLV.

Weiterhin untersuchten wir folgende Forschungsfragen:

1. Lassen sich bei Patient:innen mit dekompensierter Leberzirrhose virale Infektionen im Aszites nachweisen, wenn ja, welche?
2. Können diese als spontan virale Peritonitis (SVP) interpretiert werden?
3. Sind virale Infektionen in die Immunpathogenese eines ACLV involviert?
4. Hat der Nachweis viraler DNA im Aszites eine klinische Relevanz für Patient:innen mit dekompensierter Leberzirrhose?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine klinische Kohortenstudie, die dem
in

Abbildung 3.1 dargestellten Studiendesign folgt.

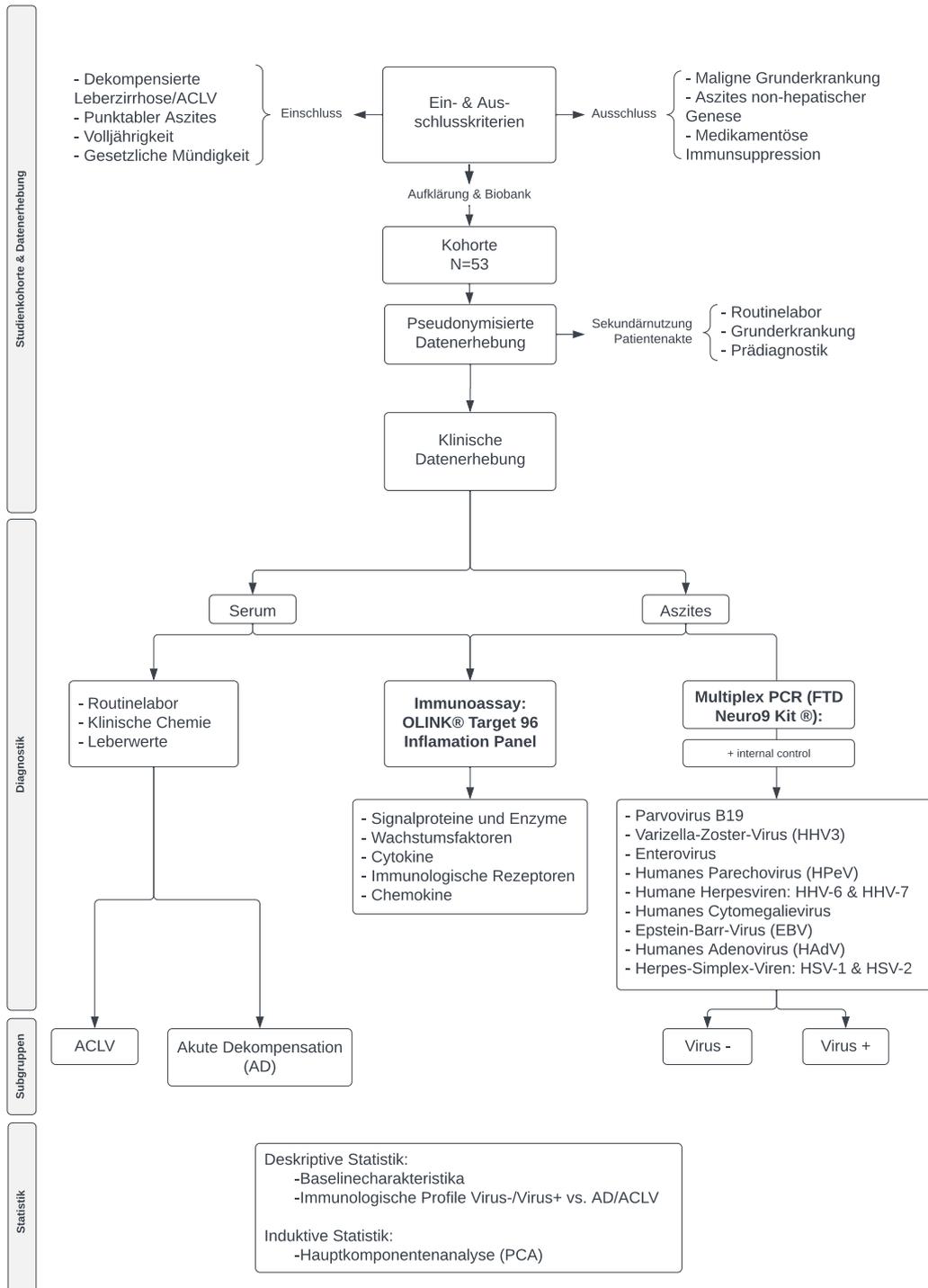


Abbildung 3.1: Studiendesign

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum von Oktober 2018 bis Juli 2021 im Medizinischen Zentrum I in der Gastroenterologie und Hepatologie im Universitätsklinik Essen durchgeführt.

3.2 Untersuchungskollektiv und Einschlusskriterien

Die Studienpopulation bilden Patient:innen, die zur Behandlung einer hepatischen Dekompensation bei bekannter Leberzirrhose und/ oder ACLV nach den CLIF-EASL Kriterien im Universitätsklinikum Essen auf eine gastroenterologische Station aufgenommen wurden und in die Studienteilnahme einwilligten. Die Diagnose der hepatischen Dekompensation war nicht auf eine Erstmanifestation beschränkt.

Einschlusskriterium war – dem Studiendesign entsprechend – eine fortgeschrittene Leberzirrhose nicht-maligner Genese mit Auftreten einer hydropischen Dekompensation in Form von Aszites, die eine stationäre Behandlung erforderte. Hierbei wurden sowohl elektiv aufgenommene Patient:innen berücksichtigt, deren weitere Diagnostik beispielsweise in Vorbereitung auf eine Lebertransplantation erfolgte, als auch nicht-elektive Aufnahmen über die zentrale Notaufnahme Nord oder notfallmäßige Übernahmen aus externen Häusern mit einer akuten Indikation zur Rekompensation und Intervention. Die Patient:innen waren alle volljährig und gesetzlich mündig.

Ausschlusskriterien stellten eine maligne Grunderkrankung wie beispielsweise ein Hepatozelluläres Karzinom oder Pankreaskarzinom dar und Aszites non-hepatischer Genese, sowie eine medikamentöse Immunsuppression. Ausgeschlossen wurden nicht volljährige oder nicht mündige Patient:innen und solche mit (vorübergehend) eingeschränkter Urteilsfähigkeit zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses durch medizinische Umstände (beispielsweise durch eine hepatische Enzephalopathie).

Alle Teilnehmer:innen gaben nach einer mündlichen und schriftlichen Aufklärung über die geplanten Probenentnahmen ihre schriftliche Einwilligung in die Studienteilnahme und in die Datenspeicherung in der Biobank.

Die Diagnose einer Leberzirrhose wurde leitliniengerecht und der Ätiologie entsprechend gestellt und basiert auf klinischen Parametern, Laborwerten und bildgebenden Verfahren wie Abdomensonografie, Transienter Elastografie (FibroScan) oder seltener einer histologischen Sicherung.

Eine hepatische Dekompensation wurde entsprechend der EASL-CLIF Richtlinien diagnostiziert mit Vorliegen von einem oder mehreren der folgenden Kriterien: die Ausbildung einer punktablen Menge Aszites entsprechend der Grade 2 und 3, Bewusstseinsentübung oder andere klinische Zeichen einer HE entsprechend der West-Haven Kriterien, gastrointestinale Hämorrhagie und/oder eine bakterielle Infektion.

3.3 Klinische Datenerhebung und Biobanking

Die Erhebung der demografischen und klinischen Daten erfolgte aus den digitalisierten sowie teilweise noch analog geführten Akten für den Zeitraum des aktuellen Krankenhausaufenthaltes. Alle erhobenen Parameter wurden tabellarisch festgehalten und unmittelbar pseudonomisiert.

Erhoben wurden: Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht, konsekutive Body-Mass-Index (BMI) berechnet aus $\frac{\text{Körpermasse in kg}}{\text{Körpergröße in m}^2}$, Diagnose und Ätiologie bzw. Genese der Leberzirrhose mit oder ohne aktiven Alkoholkonsum, das Vorliegen eines Diabetes Mellitus, vorhandene Zeichen einer Dekompensation in Form von Aszites mit seiner Ausprägung, Ösophagusvarizen mit oder ohne stattgehabter gastrointestinalen Hämorrhagie, einer hepatischen Enzephalopathie entsprechende der West-Haven Kriterien, Vorliegen einer Infektion, Einsatz von Nierenersatzverfahren, Blutdruck und MAD mit ggf. Einsatz von Katecholaminen und/oder einem Vasopressor (Terlipressin), sowie die Lungenfunktion mittels $\frac{PaO_2}{FiO_2}$.

Die Laborwerte wurden den stationären Routinekontrollen entnommen. Hierzu gehören: Leukozyten in $\frac{l}{nl}$, Hämoglobin in $\frac{g}{dl}$, Thrombozyten in $\frac{l}{nl}$, GOT bzw. Serum Aspartate Aminotransferase (AST) in $\frac{U}{l}$, GPT bzw. Serum Alanin Aminotransferase (ALAT) in $\frac{U}{l}$, Gamma-Glutamyltransferase (GGT) in $\frac{U}{l}$, Serum Alkaline Phosphatase (AP) in $\frac{U}{l}$, international normalized Ratio (INR), Serum Natrium in $\frac{mmol}{l}$, Serum Kreatinin in $\frac{mg}{dl}$, Serum Bilirubin in $\frac{mg}{dl}$, C-reaktives Protein (CRP) in $\frac{mg}{dl}$, Serum Gesamt-Eiweiß in $\frac{g}{dl}$ und Serum Albumin in $\frac{g}{dl}$.

Für alle Patient:innen wurde der Child-Pugh-Score sowie der MELD- Score berechnet. Die Formeln und Grundannahmen dieser Scores wurden in der Einleitung präzisiert. Ferner wurde der Schweregrad der Erkrankung anhand der EASL-CLIF Scoringsysteme CLIF-C-OF, CLIF-C-AD und CLIF-C-ACLF differenziert. Die genannten Scores und ihre Formeln wurden in Hinblick auf die Definition eines ACLV und der einzelnen Organversagen ebenfalls in der Einleitung bereits näher beschrieben.

Zur Berechnung wurde der online erreichbare offizielle Rechner des CLIF-Konsortiums verwendet: <https://www.efclif.com/scientific-activity/score-calculators/clif-c-aclf> sowie <https://www.efclif.com/scientific-activity/score-calculators/clif-c-ad> (beide zuletzt aufgerufen am 08.11.2022).

Zudem wurde zwischen elektiv- und notfallmäßig erfolgter Aufnahme unterschieden und der Verlauf mit oder ohne Behandlung auf der Intensiv- oder Überwachungsstation festgehalten.

3.4 Probenakquirierung und -verarbeitung

Abgesehen von der Datenerhebung klinischer Parameter aus den Akten erfolgte bei jedem/r Patient:in im stationären Aufenthalt die Probenakquirierung von je Blutserum und Aszites für die Studiendiagnostik. Für die Aszitespunktion lag die medizinische Indikation des Eingriffes immer unabhängig von der durchgeführten Studie vor. Blutserum und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden zur weiterführenden immunologischen Diagnostik außerhalb der Routinediagnostik akquiriert, nach Möglichkeit jedoch in die täglichen Routineblutentnahmen integriert.

3.4.1 Aszites

Die Gewinnung von Aszites erfolgte ausschließlich im Rahmen einer leitliniengerechten medizinischen Indikation durch die behandelnden Ärzt:innen zu therapeutischen Zwecken einer Rekompensation oder weiterführenden Diagnostik der vorliegenden dekompensierten Leberzirrhose.

Hierfür wurde nach schriftlicher Aufklärung die Punktionsstelle bildgestützt mittels Abdomensonografie und bevorzugt im linken unteren Quadranten des Abdomens festgelegt. Bei nicht analgosedierten Patient:innen erfolgte unter streng sterilen Bedingungen eine Lokalanalgesie mit der Applikation von Mercain 5%. Anschließend erfolgte entweder eine Parazentese mit dem Einmalpunktionsset oder die Anlage eines Pigtail-Katheters zur wiederholten Entlastung von Aszites. Die Kanüle wurde ohne Vakuum mit einem Abflusssystem verbunden und der Aszites steril aufgefangen. Bei Blutdruckstabilität wurde die Kanüle zur gänzlichen Drainage von Ergussflüssigkeit belassen. Bei

Schmerzen, neu auftretendem Blut im Ablaufschlauch, Blutdruckunregelmäßigkeiten oder Unwohlsein sowie nach individueller Beurteilung durch das medizinische Personal wurde die Parazentesenadel vorzeitig entfernt. Die verbleibende Einstichstelle wurde mit einem Tupfer verbunden und im Verlauf auf Fisteln und Infektionen kontrolliert.

Nach Leitlinie wurde Humanalbumin 20% bei großvolumigen Parazentesen > 5 Liter zur Vermeidung eines intravasalen Volumenmangels in Abhängigkeit von Abflussvolumen und Körpergewicht der Patient:innen substituiert.

Im routineklinischen Kontext wurde Aszites in einer Serum-Monovette sowie in einer EDTA-Monovette in das Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen zur Bestimmung der Zellzahl und Zelldifferenzierung sowie Ermittlung des Eiweißgehalts geschickt. Bei Verdacht auf ein infektiöses Geschehen wurde eine weitere Diagnostik der Aszitesflüssigkeit auf Bakterien im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen veranlasst. Im Fall eines Malignitätsverdachtes wurden maligne Zellen im Aszites durch das Institut für Pathologie ausgeschlossen.

Von dem verbleibenden, quantitativ variierenden Aszites aller Patient:innen wurde in Vorbereitung auf die weitere Studiendiagnostik ein Volumen von 50 ml in Röhrchen aus dem Aszitesbeutel oder der -spritze unter sterilen Bedingungen überführt und im Medizinischen Forschungszentrum (MFZ) weiterverarbeitet.

Dort wurde das Material bei 600 x g für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Nach Auftauen der Proben wurden diese anschließend wie folgt verwendet:

1. Virologische Diagnostik zum Nachweis von Viren im Aszites:

Hierfür wurde das FTD Neuro9Kit der Firma AEC Healthcare Co., Ltd verwendet, eine Multiplex real-time PCR zum Nachweis des humanen Adenovirus, des humanen Cytomegalovirus, des Epstein-Barr-Virus, des Herpes Simplex Virus 1 & 2, des Varizella Zoster Virus, des Enterovirus, des humanen Parechovirus, des humanen Herpesvirus 6 und 7 und des humanen Parvovirus B19.

2. Untersuchung auf immunmodulatorische Biomarker zu Erstellung von Immunoassays:

Hierzu wurde das Material in Anteilen auf Trockeneis in Mikrotiterplatten 96-Well Cell Culture Plates zur Bestimmung der Proteinkonzentration zur Firma Olink Holding nach Schweden verschickt.

3.4.2 Blutserum

Die Entnahme von Blutserum erfolgte im Rahmen von stationären Routinekontrollen vor der morgendlichen Visite zwischen 8 und 10 Uhr. Hierzu wurde mit dem Aspirationsprinzip einer Venenpunktionskanüle mit einer Größe von 21G (grün) oder 23G (blau) eine geeignete periphere Vene punktiert und Blut nach allgemeinen Standards gewonnen. Das Blutserum wurde gesammelt in einer S-Monovette® Serum-Gel, einer 2,6ml S-Monovette® K3 EDTA sowie einer 5ml S-Monovette® Citrat 3,2%. Die Blutproben wurden für die im Rahmen der Visite geplanten Routinekontrolle verwendet und in das Zentrallabor der Universitätsmedizin Essen geschickt.

Zusätzlich wurden im Rahmen derselben Punktion Blut für eine 7,5ml Monovetten® Serum-Gel und weitere 7,5ml S-Monovetten® K3 EDTA gewonnen.

Diese wurden für die vorliegende Studie im MFZ wie folgt weiter behandelt: Zur Gewinnung des flüssigen Serumbestandteils erfolgte das Zentrifugieren mittels Ausschwingrotoren mit einer relativen Zentrifugalkraft von 3000 x g für 15min bei einer Temperatur von 4 °C. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Mit Auftauen der Proben wurden sie zusammen mit den Aszitesproben zur Auswertung auf Proteinbiomarker zur Firma Olink Holding nach Schweden verschickt. Der Transport erfolgte ebenfalls auf Trockeneis in 96 well plates.

3.5 Proteinbiomarker: Erstellung von Immunoassays

Die immunologische Analyse auf Proteinbiomarker erfolgte extern im Auftrag durch die schwedische Firma Olink®, SE-752 37 Uppsala. Hierfür wurde Biomaterial in Form von Aszites und Blutserum wie zuvor beschrieben verarbeitet und verschickt.

Die weitere Verwertung erfolgte durch das Labor von Olink® im Rahmen des *Target 96 Inflammation Panel*, das Immunoassays von Proteinen aus verschiedenen Biomaterialien erstellt.

Olink® verspricht mit der Proximity Extension Assay (PEA)-Technologie „eine innovative, DNA-gekoppelte Doppelerkennungsmethode, die eine außergewöhnliche

Auslesespezifität bietet“ (Our PEA technology - Olink). PEA ermögliche eine Biomarker-Analyse mit hohem Multiplex und schnellem Durchsatz, ohne in der Datenqualität einzubüßen. Der Internetauftritt der Olink® Holding ist erreichbar unter <https://www.olink.com> (zuletzt aufgerufen am 09.02.2022).

Die verwendete PEA stellt eine Methode dar, die mittels PCR-Amplifikation zwei oder mehr DNA-markierte Aptamere oder Antikörper verwenden, die an dasselbe Protein oder denselben Proteinkomplex binden. In den PEA werden ausschließlich zusammenpassende DNA-Paare hybridisiert, um ein Amplikon zu erzeugen, sodass Kreuzreaktionen und damit ein Verlust an Sensitivität und Spezifität vermieden werden. (Greenwood et al., 2015)

Zum *Target96 Inflammation Panel* gehören die in Tabelle 2 genannten Bioproteine (n=92), die alle mit Inflammationsreaktionen und deren biologischen Prozessen assoziiert werden. Die Ergebnisse der Immunoassays werden nach technischer Validation und Qualitätskontrolle (Positivkontrolle) in NPX (Normalized Protein eXpression) ausgedrückt.

Tabelle 3.1: Übersicht aller evaluierten Proteine des Target 96 Inflammation Panel der Firma Olink®

| Pro- und antiinflammatorische Biomarker (n=92) | |
|---|---------|
| Signalproteine und Enzyme (n=11) | |
| Adenosin- deaminase | ADA |
| Axin-1 | AXIN1 |
| Caspase-8 | CASP8 |
| Cystatin-D CST5 | CST5 |
| Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 | 4EBP1 |
| Interstitial collagenase | MMP1 |
| Stromelysin-2 | MMP10 |
| NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2 | SIRT2 |
| STAM-binding protein | STAMBP1 |
| Sulfotransferase 1A1 | ST1A1 |
| Urokinase-type plasminogen activator | uPA |

| Wachstumsfaktoren (n=15) | | |
|---|--|---------------|
| Artemin | | ARTN |
| Macrophage colony-stimulation factor 1 | | CSF1 |
| Fms-related tyrosine kinase 3 ligand | | Flt3L |
| Fibroblast growth factor 5 | | FGF5 |
| Fibroblast growth factor 19 | | FGF19 |
| Fibroblast growth factor 21 | | FGF21 |
| Fibroblast growth factor 23 | | FGF23 |
| Beta-nerve growth factor | | Beta- NGF |
| Glial cell line-derived neurotrophic factor | | GDNF |
| Hepatocyte growth factor | | HGF |
| Neurturin | | NRTN |
| Neurotrophin-3 | | NT-3 |
| Oncostatin-M | | OSM |
| Kit-ligand/ Stem cell factor | | SCF |
| Vascular endothelial growth factor A | | VEGF-A |
| Zytokine (n=27) | | |
| Extracellular newly identified receptor for advanced glycation end products binding protein = Protein S100A12 | | EN-RAGE |
| Interferon gamma | | IFN γ |
| Interleukin-1alpha | | IL1- α |
| Interleukin-4 | | IL4 |
| Interleukin-5 | | IL5 |
| Interleukin-6 | | IL6 |
| Interleukin-7 | | IL7 |
| Interleukin-10 | | IL10 |
| Interleukin-12 subunit beta | | IL12B |
| Interleukin-13 | | IL13 |
| Interleukin-17 A | | IL17A |
| Interleukin-17 C | | IL17C |

| | |
|--|------------------|
| Interleukin-18 | IL18 |
| Interleukin-20 | IL20 |
| Interleukin-24 | IL24 |
| Interleukin-22 receptor subunit alpha 1 | IL22RA1 |
| Interleukin-33 | IL33 |
| Transforming growth factor beta-1 proprotein= latency associated peptide | LAP/TGF- β |
| Protransforming growth factor alpha | TGF α |
| Tumor necrosis factor | TNF |
| Tumor necrosis factor beta/Lymphotoxin alpha | TNF- β |
| Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14 | TNFSF14 |
| Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 | TRAIL |
| Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 | TRANCE |
| Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12 | TWEAK |
| Thymal stromal lymphopoietin | TSLP |
| Leukemia inhibitory factor | LIF |
| Immunologische Rezeptoren (n=19) | |
| T-cell surface glycoprotein CD5 | CD5 |
| T-cell differentiation antigen CD6 | CD6 |
| T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain | CD8 α |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 | CD40 |
| Natural killer cell receptor 2B4 | CD244 |
| CUB domain- containing protein 1 | CDCP1 |
| Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor | DNER |
| Interleukin-10 receptor subunit alpha | IL10RA |
| Interleukin 10 receptor subunit beta | IL10RB |
| Interleukin- 15 receptor subunit alpha | IL15RA |
| Interleukin- 18 receptor 1 | IL18R1 |
| Interleukin- 20 receptor subunit alpha | IL20RA |
| Interleukin-2 receptor subunit beta | IL2RB |
| Interleukin- 2 | IL2 |

| | |
|--|---------|
| Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11 beta/ Osteoprotegerin | OPG |
| Programmed cell death 1 ligand 1 | PD-L1 |
| Signaling lymphocytic activation molecule | SLAMF1 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 | TNFRSF9 |
| Leukemia inhibitory factor receptor | LIF-R |
| Chemokine (n=20) | |
| C-C motif chemokine 3 | CCL3 |
| C-C motif chemokine 4 | CCL4 |
| Eotaxin | CCL11 |
| C-C motif chemokine 19 | CCL19 |
| C-C motif chemokine 20 | CCL20 |
| C-C motif chemokine 23 | CCL23 |
| C-C motif chemokine 25 | CCL25 |
| C-C motif chemokine 28 | CCL28 |
| Fractalkine | CX3CL1 |
| Growth regulated alpha protein | CXCL1 |
| C-X-C motif chemokine 5 | CXCL5 |
| C-X-C motif chemokine 6 | CXCL6 |
| C-X-C motif chemokine 9 | CXCL9 |
| C-X-C motif chemokine 10 | CXCL10 |
| C-X-C motif chemokine 11 | CXCL11 |
| Interleukin- 8 | IL8 |
| C-C motif chemokine 2= Monocyte chemoattractant protein | MCP1 |
| C-C motif chemokine 8=Monocyte chemoattractant protein | MCP2 |
| C-C motif chemokine 7= Monocyte chemoattractant protein | MCP3 |
| C-C motif chemokine 13= Monocyte chemoattractant protein | MCP4 |

3.6 Statistik, Literaturrecherche und Textverarbeitung

Für die Datenerhebung wurden alle Parameter in dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel, Version 16.61 für Mac (©2022 Microsoft) tabellarisiert. Auch die mittels Fremdversand durch die Firma Olink® erhobene Nachweise der Proteinbiomarker wurden hier archiviert.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word, Version 16.60 für Mac (©2022 Microsoft) erstellt.

Die Flow Charts wurden mit dem frei erhältlichen Lucidchart, Version 3.5.14 der ©Lucid Software Inc. erstellt.

Für die Durchführung der deskriptiven univariaten Statistik wurden die mittels Excel erhobene Datensätze mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics in der Version 24 von der Firma IBM Corporation, Armonk, New York, USA sowie mit der Statistiksoftware Prism 9 for MacOs, Version 9.3.1 (350), December 7, 202; 1994 - 2021 GraphPad Software, LLC. analysiert.

Kontinuierliche Daten werden als arithmetische Mittelwerte (MW) mit ihrer Standardabweichung (STD) und kategorische Variablen in absoluten und relativen Häufigkeiten präsentiert. Ein Test auf Normalverteilung aller Variablen wurde mittels Kolmogorov-Smirnov Test und dem Shapiro-Wilk Test durchgeführt.

Der Chi² Test wurde zum Vergleich kategorialer Variablen genutzt, kontinuierliche Variablen wurden mittels ungepaartem T-Test oder Man-Whitney-U Test auf Signifikanzen geprüft.

Für den Mittelwertvergleich der metrischen Variablen zum Vergleich von Aszites und Serum nach Subgruppen mit und ohne Virusnachweis wurde nach Test auf Normalverteilung entweder der gepaarte t-Test oder bei nicht normal verteilten Werten der Wilcoxon Test verwendet. Zum Vergleich viruspositiv getesteter Proben gegen negativ getestete Proben wurde der ungepaarte t-Test bei Normalverteilung bzw. der Man-Whitney-U Test bei nicht normalverteilten Daten gerechnet.

Alle Auswertungen erfolgten mit zweiseitigem asymptotischen Signifikanzniveau. P-Werte von unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Alle grafischen Darstellungen wurden ebenfalls mit dem Statistikprogramm Prism 9 for MacOs, Version 9.3.1 (350), December 7, 202; 1994 - 2021 GraphPad Software, LLC. erstellt.

Für die induktive Statistik mit einer multivariaten Datenanalyse wurden Hauptkomponentenanalysen (Principal Component Analysis, PCA) durchgeführt.

Die PCA stellt eine mathematische Lineartransformation dar, anhand derer große Mengen an Rohdaten (die Proteinbiomarker unserer Studienkohorte) reduziert und interpretiert werden. Es ergibt sich ein sinnvolles Koordinatensystem mit Datenclustern, die entlang der Hauptachsen (Principal Components: PC's) die maximale Varianz der Daten unter Erhaltung ihrer Merkmale darstellen. (Jolliffe and Cadima, 2016) Hierdurch gelingt einerseits eine charakteristische Datenbeschreibung, andererseits eine sinnvolle Datenreduktion von unübersichtlichen Datenmengen (Daffertshofer et al., 2004).

Hierzu wurde das Programm Qlucore Omics Explorer 3.8.2 for MacOs von der Firma Qlucore AB, Lund, Schweden verwendet, da dieses eine dreidimensionale grafische Darstellung der Hauptachsen in der Software ermöglicht.

Die Literaturrecherche wurde mit Hilfe der Datenbank der National Library of Medicine, erreichbar unter der Internetadresse <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>, durchgeführt und relevante Literatur mit Hilfe des Zitierprogrammes © 2022 Mendeley Ltd systematisch kategorisiert. Es wurden soweit möglich Primärquellen verwendet, sowie im Falle von firmenbezogenen Daten die Angaben der jeweiligen offiziellen Internetauftritte genannt.

3.7 Ethikvotum

Die Bewilligung der Studie durch die zuständige Ethikkommission an Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen lag zu Beginn der Studie (ab dem 18. Dezember 2018) vor (Registriernummer 18-8503-BO).

4 ERGEBNISSE

4.1 Patient:innencharakteristika

Insgesamt wurden 53 Patient:innen in die vorliegende Studie eingeschlossen. Anhand des CLIF-C-AD und des CLIF- C-ACLF Scores wurde der Schweregrad der Lebererkrankung beurteilt. Unterschieden wurde zwischen 38 Patient:innen mit AD (71,7%) und 15 Patient:innen mit einem ACLV (28,3%), wie in

Abbildung 4.1 dargestellt. Die Mittelwerte (MW) der CLIF-OF-Scores betragen für die AD $6,78 \pm 0,84$ versus $10,2 \pm 1,78$ in der Subgruppe der ACLV.

Die Baseline Charakteristika beider Kohorten werden in Tabelle 4.1 präsentiert und einander gegenübergestellt. Das mittlere Alter betrug 57 Jahre ($\pm 11,6$) ohne, bzw. 60 ($\pm 8,9$) Jahre mit ACLV. Mit 60,4% überwog der männliche Anteil der Patient:innen, das Geschlecht war nicht ausschlaggebend für das Krankheitsstadium ($p=0,55$). Ebenso erwiesen sich die Risikofaktoren Adipositas (BMI, $p=0,66$) und Diabetes ($p=0,97$) als nicht signifikant für das Vorliegen einer AD oder eines ACLV in dieser Kohorte.

Die Mehrheit der Patient:innen hatte als Grunderkrankung eine äthyltoxische Leberzirrhose (60,4%), von denen noch 21,2% einen aktiven Alkoholkonsum angaben. Zweithäufigste Genese war eine Fettleberhepatitis (NASH, 11,3%), wobei die unter *Sonstige* kumulativ zusammengefassten Grunderkrankungen noch 13,2% ausmachten. Hierzu zählen die kryptogene sowie stoffwechselbedingten Leberzirrhosen (Morbus Wilson, Hämochromatose).

Gemäß dem Einschlusskriterium einer vorliegenden dekompensierten Leberzirrhose entwickelten alle Patient:innen Komplikationen und/oder Organversagen.

Am häufigsten traten Infektionen mit 41,5% auf; in der Subgruppe ACLV signifikant häufiger als im Stadium der AD ohne Organversagen (73,3% vs. 28,9%, $p=0,003$). Ein Nierenversagen mit einer Kreatininkonzentration von mindestens 1,5 mg/dl ließ sich derweil bei 35,8% aller Patient:innen nachweisen und ist mit $p<0,001$ hochsignifikant für den Grad der Erkrankung. Während sich auch die Entwicklung einer HE ($p<0,001$), der Katecholamineinsatz bei Kreislaufversagen ($p<0,001$) sowie ein respiratorisches Versagen ($p=0,03$) in der Entwicklung eines ACLV als signifikante Faktoren erwiesen und mit einer häufigeren intensivmedizinischen Behandlung korrelierten ($p=0,036$), galt dies

nicht für das Auftreten von gastrointestinalen Blutungen, Ösophagusvarizen, der Ausprägung von Aszites oder eines Gerinnungsversagens.

Laborchemisch signifikant war in der Subgruppe der ACLV eine progrediente Anämie (Hämoglobinkonzentration 8,48 g/dl bei ACLV vs. 9,87g/dl bei AD; $p=0,025$). Ebenfalls signifikant verzeichnet sich ein höherer Kreatininwert (AD: 1,12 mg/dl versus ACLV: 2,45 mg/dl; $p<0,001$) und INR (AD: 1,31 versus ACLV: 1,48; $p=0,046$). Außerdem präsentierte sich der Leberfunktionsparameter Bilirubin bei Vorliegen eines ACLV mit 7,87 mg/dl signifikant höher als mit Vorliegen einer AD (2,72 mg/dl; $p=0,049$), während die Transaminasen GOT und GPT sowie die Cholestaseparameter GGT und AP keinen signifikanten Einfluss hatten.

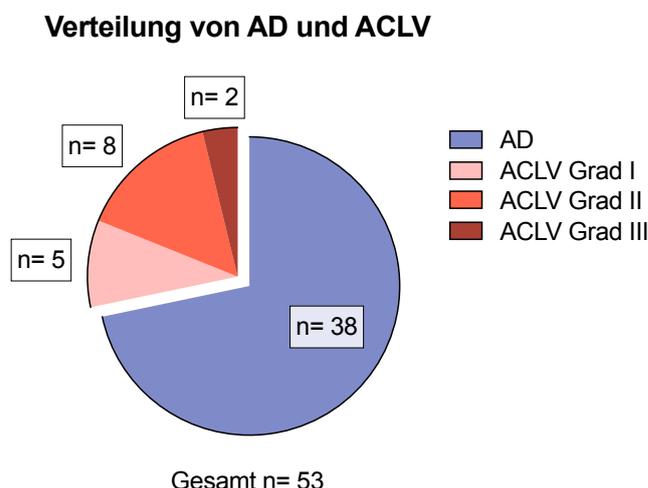


Abbildung 4.1: Prozentuale Verteilung von AD und ACLV

In der Studienkohorte (n= 53): Akute Dekompensation (n=38; 71,7%) und ACLV (n=15; 28,3%, nach Schweregrad 1-3).

Tabelle 4.1: Baseline Charakteristika aller Patient: innen

| | Gesamt (n=53) | AD (n=38) | ACLV (n=15) | p-Wert |
|----------------------------------|------------------|---------------|----------------|--------|
| Alter (Jahre), mean (STD) | 58,38 (10,93) | 57,63 (11,66) | 60 (8,89) | 0,489 |
| Geschlecht | | | | 0,55 |
| Weiblich, n (%) | 21 (39,6) | 16 (42,1) | 5 (33,3) | |
| Männlich, n (%) | 32 (60,4) | 22 (57,9) | 10 (66,7) | |

| | | | | |
|---|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|
| BMI (kg/m²), mean (STD) | 23,46 (9,33) (n=35) | 24,60 (8,15) (n=26) | 20,15 (12,07) (n=9) | 0,664 |
| Diabetes, n (%) | 14 (26,4) | 10 (26,3) | 4 (28,6) | 0,97 |
| Ätiologie | | | | 0,099 |
| Alkohol, n (%) | 32 (60,4) | 23 (60,5) | 9 (60) | |
| hiervon aktiv | 11 (21,2) | 8 (21,6) | 3 (20) | |
| Viral (HBV/HCV), n (%) | 5 (9,4) | 2 (5,3) | 3 (20) | |
| NASH, n (%) | 6 (11,3) | 3 (7,9) | 3 (20) | |
| Cholestatisch, n (%) | 3 (5,7) | 3 (7,9) | 0 (0) | |
| Sonstige, n (%) | 7 (13,2) | 7 (18,4) | 0 (0) | |
| Komplikationen/ Organversagen | | | | |
| Gastorintestinale Blutung, n (%) | 7 (13,5) (n=52) | 6 (15,8) (n=37) | 1 (6,7) | 0,361 |
| Ösophagusvarizen, n (%) | (n=49) | | | 0,418 |
| Keine | 11 (22,4) | 7 (20) | 4 (28,6) | |
| Grad 1, n (%) | 19 (38,8) | 16 (45,7) | 3 (21,4) | |
| Grad 2, n (%) | 15 (30,6) | 9 (25,7) | 6 (42,9) | |
| Grad 3, n (%) | 4 (8,2) | 3 (8,6) | 1 (7,1) | |
| Grad 4, n (%) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | |
| Hepatische Enzephalopathie n (%) | | | | <0,001 |
| Grad 1, n (%) | 9 (17) | 2 (5,3) | 7 (46,7) | |
| Grad 2, n (%) | 1 (1,9) | 1 (2,6) | 0 (0) | |
| Grad 3, n (%) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | |
| Nierenversagen, n (%) | | | | <0,001 |
| Kreatinin <1,5mg/dl, n (%) | 34 (64,2) | 33 (86,8) | 1 (6,7) | |
| Kreatinin 1,5-1,9mg/dl, n (%) | 7 (13,2) | 5 (13,2) | 2 (13,3) | |
| Kreatinin <2mg/dl oder Nierenersatzverfahren | 12 (22,6) | 0 (0) | 12 (80) | |
| Kreislaufversagen (Katecholamine), n (%) | 15 (28,3) | 6 (15,8) | 9 (60) | <0,001 |
| Respiratorisches Versagen, n (%) | 4 (7,55) | 1 (2,6) | 3 (20) | 0,03 |
| Gerinnungsversagen, n (%) | 2 (3,8) | 1 (2,6) | 1 (6,7) | 0,487 |
| Übernahme Intensivstation, n (%) | 20 (37,7) | 11 (28,9) | 9 (60) | 0,036 |
| Nachweis viraler DNA im Aszites, n (%) | 19 (35,9) | 12 (31,6) | 7 (36,8) | 0,302 |
| Laborwerte | | | | |
| Leukozyten (per nl), MW, (STD) | 7,47 (3,84) | 7,29 (3,50) | 7,91 (4,70) | 0,76 |
| Hämoglobin (per g/dl), mean (STD) | 9,48 (2,35) | 9,87 (2,44) | 8,48 (1,81) | 0,025 |

| | | | | |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Thrombozyten (per nl), mean (STD) | 151,33 (103,65) | 164,13 (114,21) | 118,93 (62,13) | 0,412 |
| CRP (mg/dl), mean (STD) | 3,38 (2,93) (n=48) | 3,02 (2,69) (n=34) | 4,24 (3,41) (n=14) | 0,173 |
| Natrium (mmol/l), mean (STD) | 135,24 (4,99) | 135,34 (4,79) | 135,0 (5,64) | 0,937 |
| Kreatinin (mg/dl), mean (STD) | 1,49 (0,83) | 1,12 (0,37) | 2,45 (0,92) | <0,001 |
| Bilirubin (mg/dl), mean (STD) | 4,18 (6,10) | 2,72 (2,40) | 7,87 (10,13) | 0,049 |
| GOT (U/L), mean (STD) | 83,18 (121,17) | 66,36 (82,60) | 125,8 (183,81) | 0,615 |
| GPT (U/L), mean (STD) | 39,55 (46,55) | 31,52 (22,50) | 61,35 (79,75) | 0,680 |
| GGT (U/L), mean (STD) | 173,39 (177,03) | 177,60 (171,44) | 162,73 (196,35) | 0,295 |
| AP (U/L), mean (STD) | 187,62 (167,33) | 179,10 (122,26) | 209,20 (252,59) | 0,248 |
| INR, mean (STD) | 1,36 (0,33) | 1,31 (0,30) | 1,48 (0,38) | 0,046 |
| Albumin (g/dL), mean (STD) | 3,1 (0,66) (n=37) | 3,15 (0,65) (n=24) | 3,18 (0,70) (n=13) | 0,949 |

Erwartungsgemäß korrelierte der Child-Pugh-Score hochsignifikant mit einem ALCV (8,18 versus 9,53 Punkte, $p = 0,007$), ebenso wie der MELD-Score (13,81 versus 25,53 Punkte, $p < 0,001$).

Tabelle 4.2: Grad der Erkrankung unserer Studienkohorte anhand gängiger Scoring-Systeme

| | Gesamt | AD (n=38) | ACLV (n=15) | p-Wert |
|--------------------------|-------------|--------------|--------------|------------------|
| Child Pugh | | | | 0,007 |
| CPS-Punkte, MW (STD) | 8,57 (1,44) | 8,18 (1,11) | 9,53 | |
| Child A (5-6), n (%) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | |
| Child B (7-9), n (%) | 43 (81,1) | 33 (86,8) | 0 (0) | |
| Child C (10-15), n (%) | 10 (18,9) | 5 (13,2) | 5 (33,3) | |
| MELD, MW (STD) | 17,3 (7,94) | 13,81 (4,95) | 25,53 (7,99) | <0,001 |
| CLIF-OF, MW (STD) | | 0,15 (0,36) | 1,8 (0,68) | <0,001 |
| Anzahl Organversagen, | 7,75 (1,94) | 6,78 (0,84) | 10,2 (1,78) | |

| MW (STD) | | | | |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|---|
| CLIF-C-AD | 50,97 (8,04) | 50,97 (8,04) | - | - |
| MW, (STD) | (n=38) | | | |
| CLIF C ACLF | 49,98 (6,59) | - | 49,98 (6,59) | - |
| MW (STD) | (n=15) | | | |

4.2 Virale DNA im Aszites

Der Aszites aller Patient:innen wurde mittels Multiplex Real-Time PCR auf den Nachweis folgender Viren untersucht:

1. Epstein Barr Virus (EBV)
2. humanes Cytomegalievirus (hCMV)
3. Varizella-Zoster-Virus (HHV-3)
4. Herpes Simplex Viren: HSV-1 und HSV-2
5. Humane Herpesviren: HHV-6 und HHV-7
6. Parvovirus B19
7. humanes Adenovirus (hAdV)
8. Humanes Parechovirus (HPeV)
9. Enterovirus

Bei über einem Drittel der Studienteilnehmer:innen (35,85%) ließ sich virale DNA von mindestens einem Erreger im Aszites nachweisen (n=19), während 34 Patient:innen (64,15%) ohne Nachweis von viraler DNA blieben.

Positivbefunde fanden sich in der ACLV-Subgruppe häufiger, respektive in 7 von 15 Fällen (46,7%), während mit AD 12 von 38 Patient:innen (31,58%) positiv getestet wurden. Statistisch ließ sich kein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich feststellen ($p=0,302$).

Bei drei Patient:innen wurden je zwei Virustypen nachgewiesen: Eine Person war Träger von sowohl EBV als auch das Parvovirus und in zwei Proband:innen fanden wir je HHV-7 und B19V, sodass insgesamt 22 positive Virusbefunde vorlagen.

Die Mehrzahl der Befunde bestand aus 7 Nachweisen von EBV (13,2%) mit einem mittleren CT-Wert von 36,7 ($\pm 1,76$) und 6 Positivbefunden des Parvovirus B19 (11,3%) mit

einem mittleren CT-Wert von 38,99 ($\pm 0,66$). Weiterhin konnte das HHV-7 in 3 Aszitesproben mit einem CT-Wert von 38,23 ($\pm 1,59$) isoliert werden. Jeweils zwei Mal fanden sich hCMV (3,8%, CT-MW 26,39 $\pm 0,95$) und hAdV (3,8%, CT-MW 36,43 $\pm 0,007$) im Aszites und ein Befund wurde je über HSV-1 (CT-Wert 37,47) und das Parechovirus (CT-Wert 36,11) erhoben.

Im Folgenden werden die Positivbefunde in Anzahl und Viruslast (MW \pm STD) in Tabelle 4.3 aufgeführt:

Tabelle 4.3: Virusbefunde (n=22) nach Erregertypen in den Subgruppen (AD und ACLV).

Virusbefunde werden präsentiert in absoluter Anzahl mit durchschnittlicher Viruslast. CT-Werte werden in MW \pm STD dargestellt.

| Positiver Virusbefund | Gesamt n, (MW \pm STD) | AD n, (MW \pm STD) | ACLV n, (MW \pm STD) |
|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| EBV | 7 (36,70 $\pm 1,76$) | 4 (37,08 $\pm 1,95$) | 3 (36,2 $\pm 1,74$) |
| B19-V | 6 (38,99 $\pm 0,66$) | 4 (38,94 $\pm 0,84$) | 2 (39,07 $\pm 0,23$) |
| HHV-7 | 3 (38,23 $\pm 1,59$) | 2 (37,79 $\pm 1,98$) | 1 (39,12) |
| hCMV | 2 (26,39 $\pm 0,95$) | 0 (0) | 2 (26,39 $\pm 0,95$) |
| HAdV | 2 (36,43 $\pm 0,007$) | 2 (36,44 $\pm 0,007$) | 0 (0) |
| HSV-1 | 1 (37,47) | 1 (37,47) | 0 (0) |
| Parechovirus | 1 (36,11) | 1 (36,11 ± 0) | 0 (0) |

Von den 7 Patient:innen mit EBV-Nachweis hatten drei ein ACLV und vier eine AD ohne Multiorganversagen. Eine statistische Signifikanz lässt sich hieraus nicht ableiten ($p=0,359$), ebenso nicht für die 6 Einzelbefunde des Parvovirus ($p=0,771$).

Zu allen weiteren Virustypen ist eine Überprüfung des Signifikanzniveaus im Einzelnen aufgrund der geringen Anzahl statistisch nicht sinnvoll. Die Verteilung der Virusbefunde nach Erregern wird grafisch in

Abbildung 4.2 dargestellt.

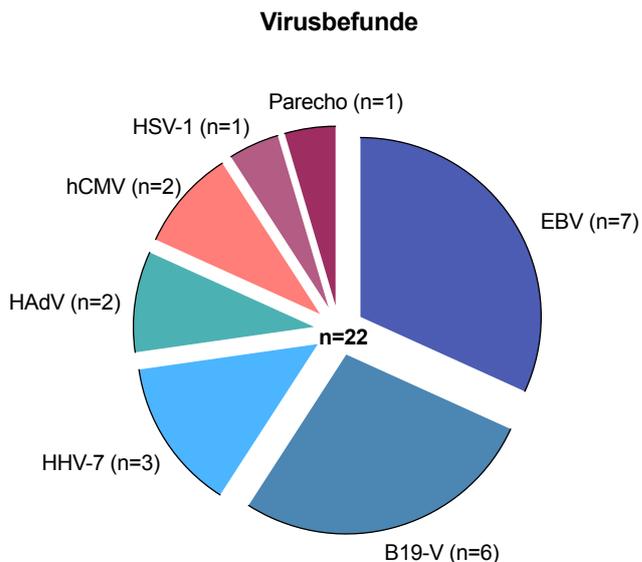


Abbildung 4.2: Verteilung aller Virusbefunde mit DNA-Nachweis im Aszites

4.3 Vergleich immunologischer Profile

Sowohl im Aszites als auch im Serum wurde die quantitative und qualitative Expression von je 92 an inflammatorischen Prozessen beteiligte humane Proteinbiomarker untersucht. Diese bestehen aus Signalproteinen und Enzymen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, immunologischen Rezeptoren sowie Chemokinen. Eine Übersicht aller Proteine wurde bereits unter Material und Methoden gelistet (vgl. Tabelle 3.1).

Im Serum konnte die PEA nicht bei allen Patient:innen erfolgen, sondern beschränkt sich auf n= 44 Patient:innen. Aus diesem Grund ist die weitere Statistik des immunologischen Vergleichs der Kompartimente Serum und Aszites auf die Subgruppe von 44 Patient:innen reduziert. Analysen, die sich auf das Kompartiment Aszites beschränken, wurden mit allen 53 Patient:innen gerechnet.

Die Proteinbiomarker werden, in ihre funktionellen Gruppen klassifiziert, in den Tabellen 3.4 bis 3.8 alphabetisch aufgeführt und nach Kompartimenten mit- und untereinander auf signifikante Unterschiede verglichen. Die Vergleiche wurden wie folgt durchgeführt:

1. Vergleich der immunologischen Proteinexpression zwischen den Kompartimenten: Aszites vs. Serum
 - a. innerhalb der Subgruppe mit negativem Virusnachweis

- b. in der Subgruppe mit positivem Virusnachweis.
2. Vergleich der Proteinexpression in Abhängigkeit von: positiver oder negativer Virusdiagnostik
- a. Innerhalb des Kompartiments Serum
 - b. Innerhalb des Kompartiments Aszites

Da es sich aufgrund der numerisch großen Menge an evaluierten Proteinen um einen sehr umfangreichen Datensatz handelt, wurde auf die tabellarische Angabe von arithmetischen Mittelwertem und Standarddeviationen verzichtet und die grafische Aufbereitung der Daten im Ergebnisteil exemplarisch auf wichtige signifikante Proteine beschränkt, die im Anschluss näher beschrieben werden. Die Darstellung aller anderen Proteine erfolgt zur Vollständigkeit im Anhang.

4.3.1 Signalproteine und Enzyme

Insgesamt wurde die Expression von 11 Signalproteinen und Enzymen in Aszites und Serum untersucht. Ein signifikant abweichendes Profil der beiden Kompartimente fällt durch 9 von 11 Biomarkern auf. In der Subgruppe virusnegativer Patient:innen verdeutlichen sich hochcharakteristische immunologische Profile mit einem Signifikanzniveau $p < 0,0001$ in der Expression 7 verschiedener Signalproteine und Enzyme.

In 2 Fällen (ADA, MMP1) lässt sich auch in Abhängigkeit eines positiven Virusbefundes eine signifikante Abweichung nachweisen.

Signifikante Profile werden exemplarisch in Abbildung 4.3 grafisch dargestellt und beschrieben, sowie in Tabelle 4.4 in Gänze mit dem jeweiligen Signifikanzniveau gelistet.

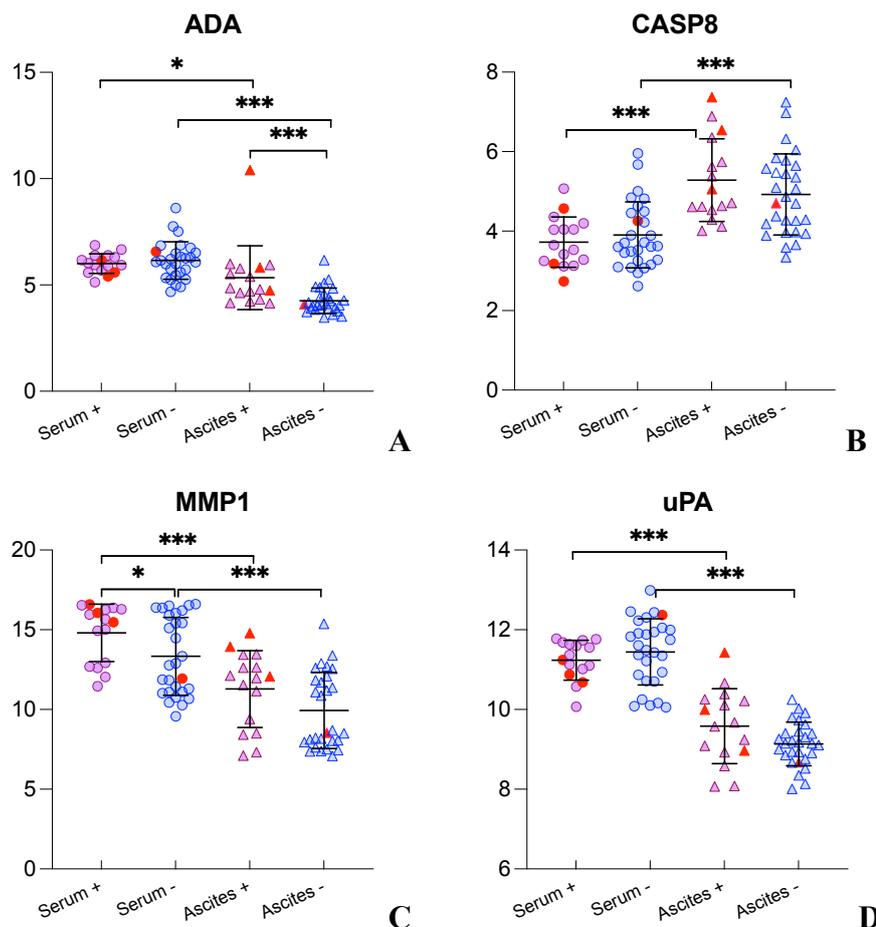


Abbildung 4.3: Signifikante Signalproteine und Enzyme

(A) Adenosin Deaminase (ADA), (B) Caspase 8 (CASP8), (C) Matrix Metallopeptidase 1 (MMP1), (D) Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA).

Biomarker aus Aszites und Serum von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n = 16) und negativem (-, n = 28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

ADA (Adenosine Deaminase) ist ein Enzym, das in Aszites und Serum signifikant unterschiedlich exprimiert wird, sowohl in der Subgruppe der viruspositiven Patient:innen (Serum MW $6,01 \pm 0,46$ vs. Aszites MW $5,34 \pm 1,5$; p = 0,0155) als auch in der virusnegativen Subgruppe (Serum MW $6,15 \pm 0,88$ vs. Aszites MW $4,26 \pm 0,60$; p < 0,0001). Zudem zeigt ADA alleinig unter den Signalproteinen und Enzymen eine hochsignifikant höhere Expression im Aszites im Falle eines vorliegenden Virusnachweises (MW $5,34 \pm 1,5$) als ohne virologischen Befund (MW $4,26 \pm 0,60$; p = 0,0002).

CASP8 (Caspase 8), eine Protease, zeigt hochsignifikante Unterschiede zwischen der CASP8 Expression in Aszites und Serum sowohl in der Subgruppe von Patient:innen mit Virusnachweis ($p=0,0003$), als auch in der Subgruppe ohne Virusnachweis ($p=0,0007$). Im Aszites ist CASP8 mit einem MW von $5,3 \pm 1,0$ (Virus +) und $4,9 \pm 1,0$ (Virus -) signifikant höher nachweisbar als im Serum (MW (Virus +) $3,7 \pm 0,63$ und MW (Virus -) $4,9 \pm 1,0$). Das Kriterium eines Virusnachweises ist nicht ausschlaggebend bzw. nicht signifikant innerhalb der einzelnen Kompartimente (Serum $p= 0,4531$ und Aszites $p=0,276$).

Ähnlich verhalten sich das Enzym **MMP1** (Matrix Metalloproteinase 1), das auch interstielle Kollagenase oder Fibroblasten-Kollagenase genannt wird, sowie **uPA**, ein Urokinase Plasminogen Aktivator. Beide Enzyme zeigen ebenfalls hoch signifikante Unterschiede ($p<0,001$) zwischen ihrer Expression im Aszites und Serum, wobei sich ein höherer Nachweis von MMP1 und uPA im Serum ergab als im Aszites: MMP1 Serum MW $15 \pm 1,8$ (Virus +) und $13 \pm 2,4$ (Virus -) vs. Aszites MW $11 \pm 2,4$ (Virus +) und $9,9 \pm 2,4$ (Virus -); $p < 0,0001$. uPA wird in Aszites signifikant ($p<0,0001$) weniger exprimiert (MW $9,6 \pm 0,94$ (Virus +) und $9,1 \pm 0,55$ (Virus -)) als in Serum mit einem MW von $11 \pm 0,5$ (Virus +) und $11 \pm 0,83$ (Virus -).

Innerhalb der Kompartimente ist ein positiver oder negativer Virusnachweis für die Expression nicht signifikant ausschlaggebend. Unter den Signalproteinen und Enzymen erwiesen sich CST5 und 4EBP1 als nicht signifikant, weder innerhalb der Kompartimente Aszites und Serum in Abhängigkeit eines Virusnachweises noch zwischen den Kompartimenten an sich. Grafisch dargestellt werden sie im Anhang.

Tabelle 4.4: Signalproteine und Enzyme (n=11)

Signifikanzen werden zwischen Aszites und Serum innerhalb der Subgruppen mit positivem (+) und negativem (-) Virusnachweis dargestellt. Es werden außerdem Signifikanzen in Abhängigkeit einer Virusdiagnostik in den Kompartimenten Serum und Aszites getrennt voneinander dargestellt.

| Signalproteine und Enzyme | Vergleich Aszites vs. Serum | | Vergleich pos. und neg. Virusnachweis (+ vs. -) | |
|------------------------------|--------------------------------|----------------------|--|------------------|
| | Virus positiv (+) | Virus negativ (-) | Serum | Aszites |
| ADA | 0,0155* | <0,0001*** | 0,5513 | 0,0002*** |
| AXIN1 | 0,4292 | 0,0011** | 0,9738 | 0,0525 |
| CASP8 | 0,0003*** | 0,0007*** | 0,4531 | 0,2760 |
| CST5 | 0,4624 | 0,9569 | 0,3759 | 0,2659 |
| 4EBP1 | 0,3996 | 0,4338 | 0,5058 | 0,2162 |
| MMP1 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,0487* | 0,0768 |
| MMP10 | 0,0001*** | <0,0001*** | 0,6487 | 0,3726 |
| SIRT2 | 0,7739 | 0,0027** | 0,1551 | 0,0519 |
| STAMBP1 | 0,0654 | <0,0001*** | 0,0418* | 0,0688 |
| ST1A1 | 0,0507 | <0,0001*** | 0,3908 | 0,6825 |
| uPA | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,3682 | 0,0520 |

4.3.2 Wachstumsfaktoren

Insgesamt wurden 15 Wachstumsfaktoren analysiert, wovon 13 Proteine eine signifikant abweichende Expression in den Kompartimenten Serum versus Aszites aufwiesen, darunter 8 unabhängig eines Virusnachweises (signifikant in beiden Subgruppen): CSF 1, Flt3L, FGF5, FGF19, FGF21, FGF23, Beta-NGF sowie OSM. Innerhalb des Kompartiments Serum ergaben sich in Abhängigkeit eines Virusnachweises keine Signifikanzen. Im Aszites unterscheidet sich die Proteinexpression in 4 Fällen signifikant nach positivem oder negativen Virusbefund bei CSF1, OSM, SCF sowie VEGF-A. Die wichtigsten Wachstumsfaktoren werden in Abbildung 4.4 und Tabelle 4.5 dargestellt.

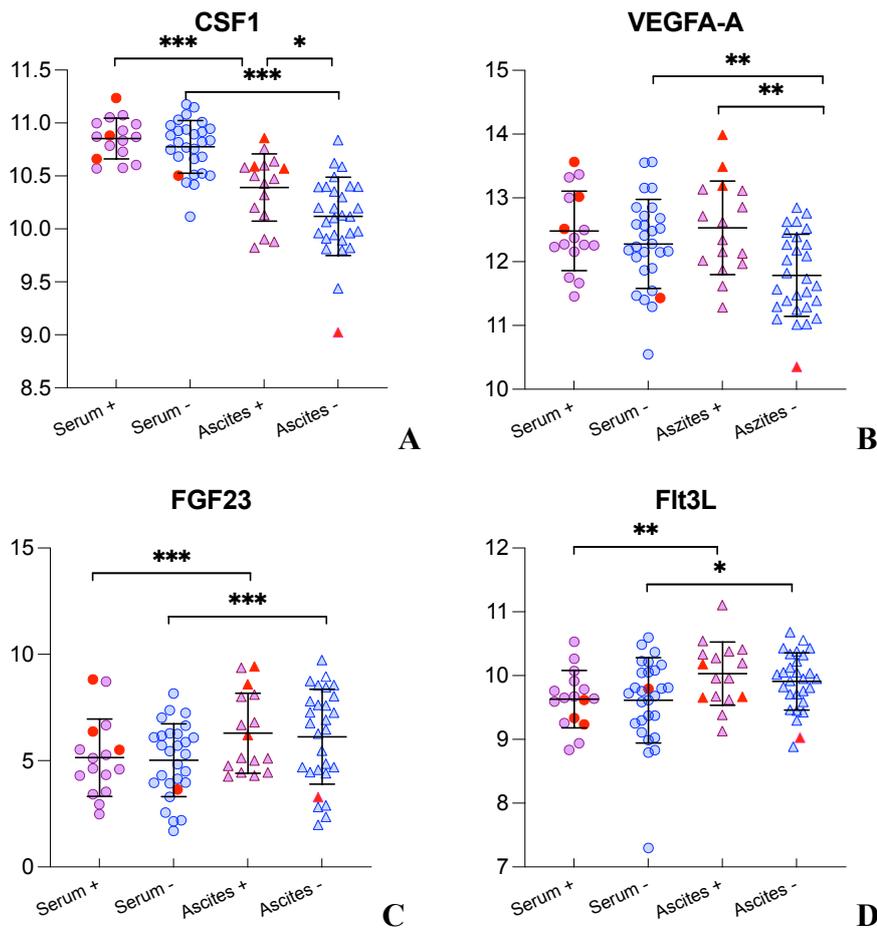


Abbildung 4.4: Signifikante Wachstumsfaktoren

(A) Colony stimulating Factor 1 (CSF1), (B) Vascular endothelial growth factor (VEGF-A), (C) Vascular endothelial growth factor (VEGF-A), (D) Fms-related Tyrosine Kinase 3 Ligand (Flt3L).

Biomarker aus Aszites und Serum von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n =16) und negativem (-, n =28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet:

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Am Beispiel von CSF1, VEGF-A, FGF23 und Flt3L werden das Signifikanzniveau und die NPX-Werte grafisch dargestellt.

Das Profil von **CSF1 (Colony stimulating Factor 1)** unterscheidet sich in Serum und Aszites sowohl mit positivem als auch negativem Virusnachweis hochsignifikant voneinander (jeweils $p < 0,0001$). Mit MW von $10,39 \pm 0,32$ (Aszites, Virus +) und $10,12 \pm 0,37$ (Aszites, Virus -) werden signifikant geringere NPX-Werte gemessen als im Serum mit Mittelwerten von $10,85 \pm 0,19$ (Virus +) und $10,78 \pm 0,25$ (Virus -). Andererseits

zeigt sich innerhalb des Kompartiments Aszites eine signifikant höhere Expression von CSF1, wenn ein positiver Virusnachweis vorliegt (MW $10,39 \pm 0,32$ vs. $10,12 \pm 0,37$; $p=0,0179$). Ebenfalls signifikant höher exprimiert ($p=0,003$) wird **VEGF-A** bei viruspositiven als -negativen Patient:innen im Aszites (MW $13 \pm 0,73$ vs. $12 \pm 0,64$). Weiterhin zeigen sich signifikant ($p=0,001$) höhere NPX-Werte im Serum (Virus -) als im Aszites (Virus -). Zwei Patient:innen mit SBP markieren jeweils die zwei höchsten positiven Werte in der viruspositiven, sowie den niedrigsten Wert in der virusnegativen Subgruppe. Betrachtet man diese Werte als Ausreißer, bleibt eine Signifikanz von $p=0,0485$.

Andersherum verhalten sich **FGF23 (Fibroblast growth factor 23)** und **Flt3L (Fms-related Tyrosine Kinase 3 Ligand)** mit signifikant höheren Mittelwerten im Aszites als im Serum, wie grafisch unter Abbildung 3.4 dargestellt. Innerhalb der Kompartimente Aszites und Serum ergaben sich bei diesen Proteinen keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.5: Wachstumsfaktoren (n=15)

Signifikanzen werden zwischen Aszites und Serum innerhalb der Subgruppen mit (+) und ohne (-) Virusnachweis dargestellt. Es werden außerdem Signifikanzen in Abhängigkeit einer positiven oder negativen Virusdiagnostik in den Kompartimenten Serum und Aszites getrennt voneinander dargestellt.

| Wachstumsfaktoren | Vergleich Aszites vs. Serum | | Vergleich pos. und neg. Virusnachweis (+ vs. -) | |
|-------------------|--------------------------------|----------------------|--|----------------|
| | Virus positiv (+) | Virus negativ (-) | Serum | Aszites |
| ARTN | 0,3868 | 0,0298* | 0,9999 | 0,0487 |
| CSF1 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,2839 | 0,0179* |
| Flt3L | 0,0079** | 0,0204* | 0,7084 | 0,4072 |
| FGF5 | 0,0443* | 0,0136* | 0,4759 | 0,4321 |
| FGF19 | 0,0058** | 0,0236* | 0,219 | 0,1263 |
| FGF21 | 0,0109* | 0,0362* | 0,5919 | 0,8187 |
| FGF23 | <0,0001*** | 0,0008*** | 0,9519 | 0,9327 |
| GDNF | 0,860 | 0,003** | 0,281 | 0,230 |
| Beta-NGF | 0,0034** | 0,0001*** | 0,1699 | 0,5541 |
| HGF | 0,6588 | 0,0013** | 0,1174 | 0,4572 |
| NRTN | 0,5619 | 0,8489 | 0,5380 | 0,5221 |
| NT-3 | 0,4037 | <0,0001*** | 0,2496 | 0,0615 |

| | | | | |
|--------|---------|-----------|--------|----------|
| OSM | 0,0182* | 0,0001*** | 0,2725 | 0,0261* |
| SCF | 0,7467 | 0,0882 | 0,4712 | 0,0053** |
| VEGF-A | 0,79 | 0,001** | 0,404 | 0,003** |

4.3.3 Zytokine

Die untersuchten 27 Zytokine werden in Tabelle 4.6 sowie Abbildung 4.5 zusammengefasst. 22 von ihnen erweisen sich als signifikant charakteristisch exprimiert in Aszites und Serum, fünf Zytokine weisen in keiner Subgruppe signifikante Unterschiede auf.

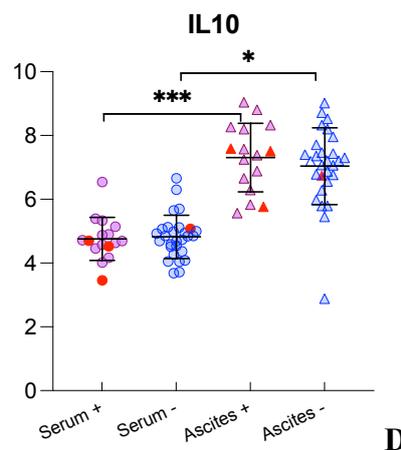
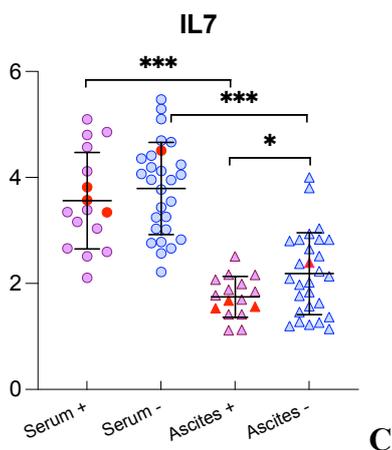
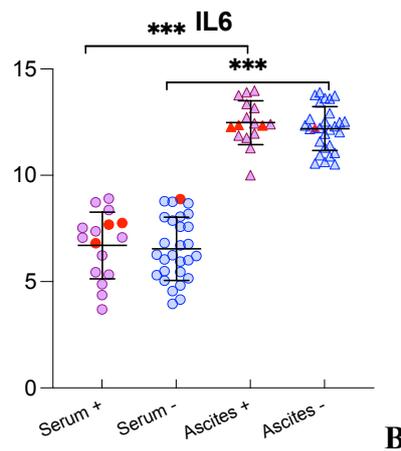
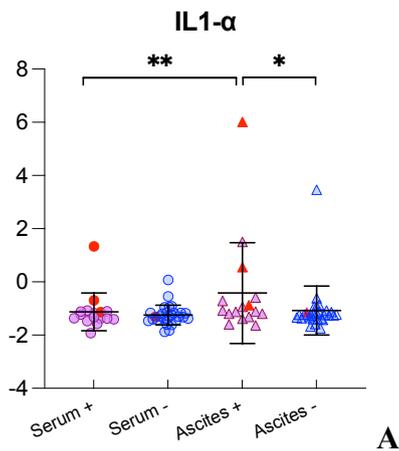
Eine Virusinfektion verändert das Entzündungsmuster im Aszites durch die signifikant abweichende Expression der Zytokine EN-RAGE, IL1- α , IL7, IL12B sowie TNFSF14.

Tabelle 4.6: Zytokine (n=27)

Signifikanzen werden zwischen Aszites und Serum innerhalb der Subgruppen mit (+) und ohne (-) Virusnachweis dargestellt. Es werden außerdem Signifikanzen der Proteinexpression in Abhängigkeit einer positiven oder negativen Virusdiagnostik in den Kompartimenten Serum und Aszites getrennt voneinander dargestellt.

| Zytokine | Vergleich Aszites vs. Serum | | Vergleich pos. und neg. Virusnachweis (+ vs. -) | |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|--|----------------|
| | Virus positiv (+) | Virus negativ (-) | Serum | Aszites |
| EN-RAGE | 0,0386* | <0,0001*** | 0,4224 | 0,0279* |
| IFN- γ | 0,5282 | 0,4571 | 0,5065 | 0,3327 |
| IL1-α | 0,0076** | 0,3620 | 0,7264 | 0,0459* |
| IL4 | 0,0214* | 0,0020** | 0,4911 | 0,7084 |
| IL5 | 0,1005 | <0,0001*** | 0,2810 | 0,3391 |
| IL6 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,747 | 0,394 |
| IL7 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,409 | 0,0400* |
| IL10 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,7641 | 0,4610 |
| IL12B | 0,0062** | <0,0001*** | 0,4718 | 0,0483* |
| IL13 | 0,0507 | 0,0011** | 0,0949 | 0,1624 |
| IL17A | 0,8603 | 0,0017** | 0,8375 | 0,2703 |
| IL17C | 0,5425 | 0,0136* | 0,6037 | 0,1412 |
| IL18 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,9334 | 0,1266 |
| IL20 | 0,4082 | 0,3223 | 0,5928 | 0,5424 |

| | | | | |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------|---------------|
| IL22RA1 | 0,8561 | 0,6430 | 0,6909 | 02463 |
| LAP/ TGF- β | 0,0012** | <0,0001*** | 0,117 | 0,257 |
| IL24 | 0,0010** | 0,0007*** | 0,6166 | 0,1777 |
| IL33 | 0,0554 | 0,5979 | 0,1434 | 0,8945 |
| TGF α | 0,0003*** | <0,0001*** | 0,5221 | 0,3045 |
| TNF | 0,9399 | 0,0379 | 0,6552 | 0,0901 |
| TNF β | 0,0042** | <0,0001*** | 0,1160 | 0,4464 |
| TNFSF14 | 0,0066** | <0,0001*** | 0,5789 | 0,0370* |
| TRAIL | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,9934 | 0,2115 |
| TRANCE | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,8378 | 0,8210 |
| TWEAK | 0,0052** | <0,0001*** | 0,0345* | 0,7264 |
| TSLP | 0,9399 | 0,0007*** | 0,8375 | 0,1027 |
| LIF | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,4763 | 0,4065 |



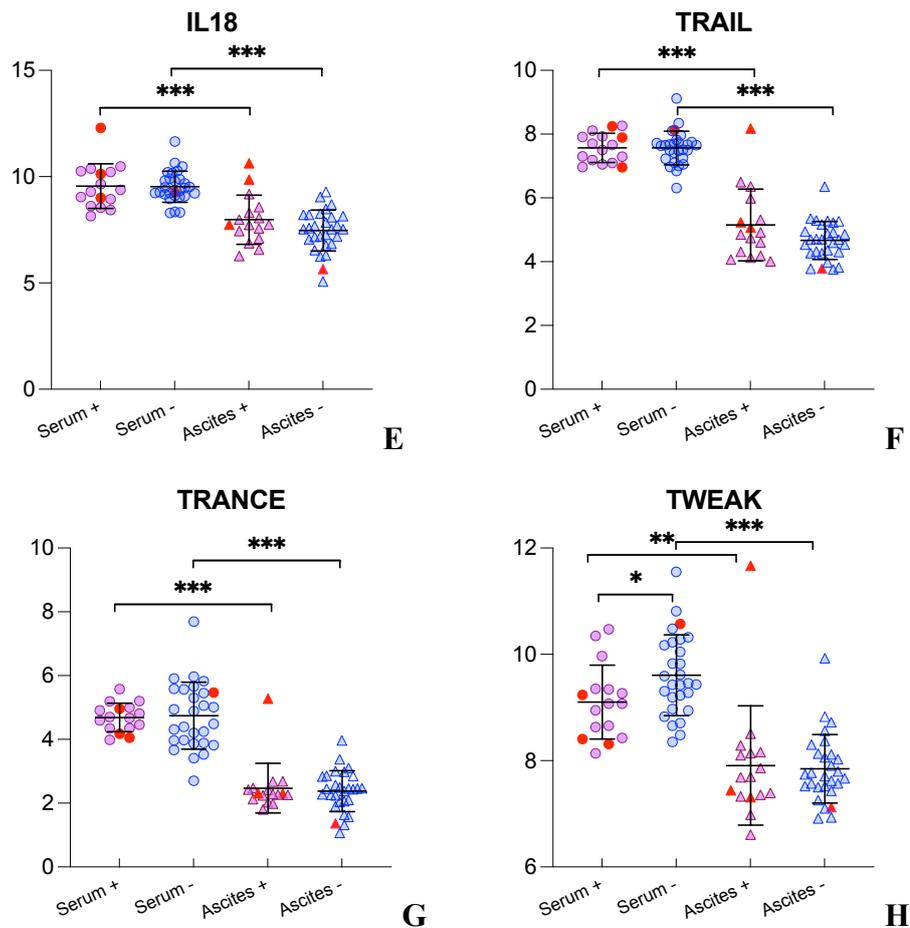


Abbildung 4.5: Signifikante Interleukine und Zytokine

(A) Interleukin 1 alpha (IL1 α), (B) Interleukin 6 (IL6), (C) Interleukin 7 (IL7), (D) Interleukin 10 (IL10), (E) Interleukin 18 (IL18), (F) Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), (G) Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE), (H) Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Biomarker aus Aszites und Serum von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n =16) und negativem (-, n =28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet:

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Auffällig stellt sich die Gruppe der Interleukine unter den Zytokinen mit hochsignifikanten Unterschieden in der Expression in Aszites und Serum dar, wie am Beispiel von **IL1a**, **IL6**, **IL7**, **IL10** und **IL18** grafisch dargestellt.

IL1a ist im Aszites virusabhängig signifikant höher exprimiert als im Serum (MW -0,42 vs. -1,1). Auch im Vergleich zum Kompartiment Serum (MW -1,1) wird IL1a quantitativ vermehrt produziert.

Signifikant höhere Messungen im Aszites zeigten sich bei IL6 sowie IL10: Die Mittelwerte von IL6 im Aszites stehen mit $12 \pm 1,0$ (Virus + und Virus -) niedrigeren Mittelwerten im Serum mit $6,7 \pm 1,6$ (Virus +) und $6,5 \pm 1,5$ (Virus -) gegenüber (jeweils $p < 0,0001$).

IL10 dominiert im Aszites mit MW von $7,3 \pm 1,1$ (Virus +) und $7,0 \pm 1,2$ (Virus -), während im Serum in beiden Subgruppen ein signifikant geringerer MW von $4,8 \pm 0,68$ nachweisbar ist (jeweils $p < 0,0001$).

IL7 und IL18 verhalten sich andersherum mit hochsignifikant niedrigerer Expression im Aszites als im Serum (jeweils $p < 0,0001$). IL7 weist dabei außerdem unter den viruspositiven Patient:innen ebenfalls signifikant geringere Werte im Aszites auf, als im Serum detektierbar sind (MW $1,7 \pm 0,38$ versus MW $2,2 \pm 0,77$; $p = 0,04$).

TWEAK (Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing Ligand) und TRANCE (Tumor necrosis factor (TNF)-related activation-induced cytokine) wurden im Aszites mit signifikant niedrigeren Werten nachgewiesen als im Serum (TRAIL und TRANCE jeweils $p < 0,0001$, TWEAK $p = 0,0052$ (Virus +) und $p < 0,0001$ (Virus -)).

TWEAK zeigt nicht nur signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten Aszites und Serum, sondern auch im Serum in den Subgruppen mit positivem und negativem Virusnachweis. So ergab sich im Serum bei Patient:innen ohne Virusnachweis ein signifikant höherer Nachweis von TWEAK als unter den Patient:innen mit Virusnachweis ($p = 0,0345$) mit einem MW von $9,6 \pm 0,76$ (Virus -) versus $9,1 \pm 0,7$ (Virus +).

4.3.4 Immunologische Rezeptoren

Insgesamt wurden 19 immunologische Rezeptoren im Aszites und Serum analysiert und auf signifikante Differenzen in ihrer Expression bei Patient:innen mit und ohne Virusnachweis im Aszites getestet. Lediglich im Zytokinrezeptor OPG (Osteoprotegerin) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression. Alle anderen 18 Rezeptoren wiesen ein signifikantes Profil in Aszites und Serum auf. Sie werden ebenfalls in Tabelle 4.7 dargestellt.

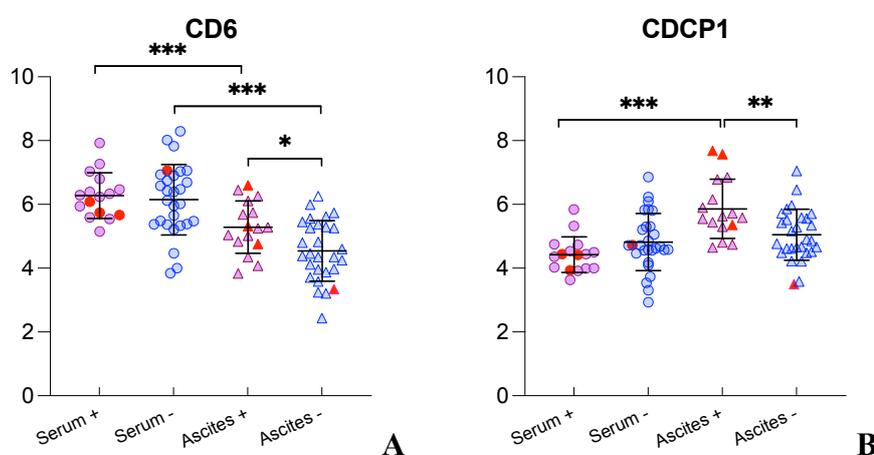


Abbildung 4.6: Signifikante immunologische Rezeptoren (1)

(A) T-cell differentiation antigen (CD6), **(B)** CUB domain- containing protein 1 (CDCP)

Biomarker aus Aszites und Serum von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n =16) und negativem (-, n =28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

CD6 (T-cell differentiation antigen CD6) ist ein Molekül für Zelladhäsion, das die T-Zell-Antwort verstärkt. Sowohl im Vergleich der CD6-Expression in Aszites und Serum zeigen sich hochsignifikante Differenzen als auch im Kompartiment Aszites in Abhängigkeit einer Virusdiagnostik. Während im Serum höhere Mittelwerte von $6,3 \pm 0,72$ (Virus +) und $6,2 \pm 1,1$ (Virus -) nachweisbar sind, ist die Expression mit MW von $5,3 \pm 0,82$ und $4,5 \pm 0,95$ signifikant niedriger ($p=0,0008$ (Virus +) und $p < 0,0001$ (Virus -)).

Vergleicht man die Expression von CD6 im Aszites zwischen Viruspositiven und -negativen Patient:innen, ergibt sich ein signifikant höheres Vorkommen ($p=0,0124$) des Rezeptors im Aszites bei positiver Diagnostik.

Auch bei **CDCP1** ist in dieser Subgruppe ein höherer Nachweis mit einem MW von $5,9 \pm 0,93$ versus $5,0 \pm 0,8$. Im Vergleich von Aszites und Serum weist CDCP1 allerdings im Gegensatz zu CD6 eine geringere Konzentration auf als im Aszites: MW $4,4 \pm 0,56$ vs. $5,9 \pm 0,93$ ($p=0,0001$, Virus +) und MW $4,8 \pm 0,89$ vs. $5,0 \pm 0,8$ ($p=0,3826$, Virus -).

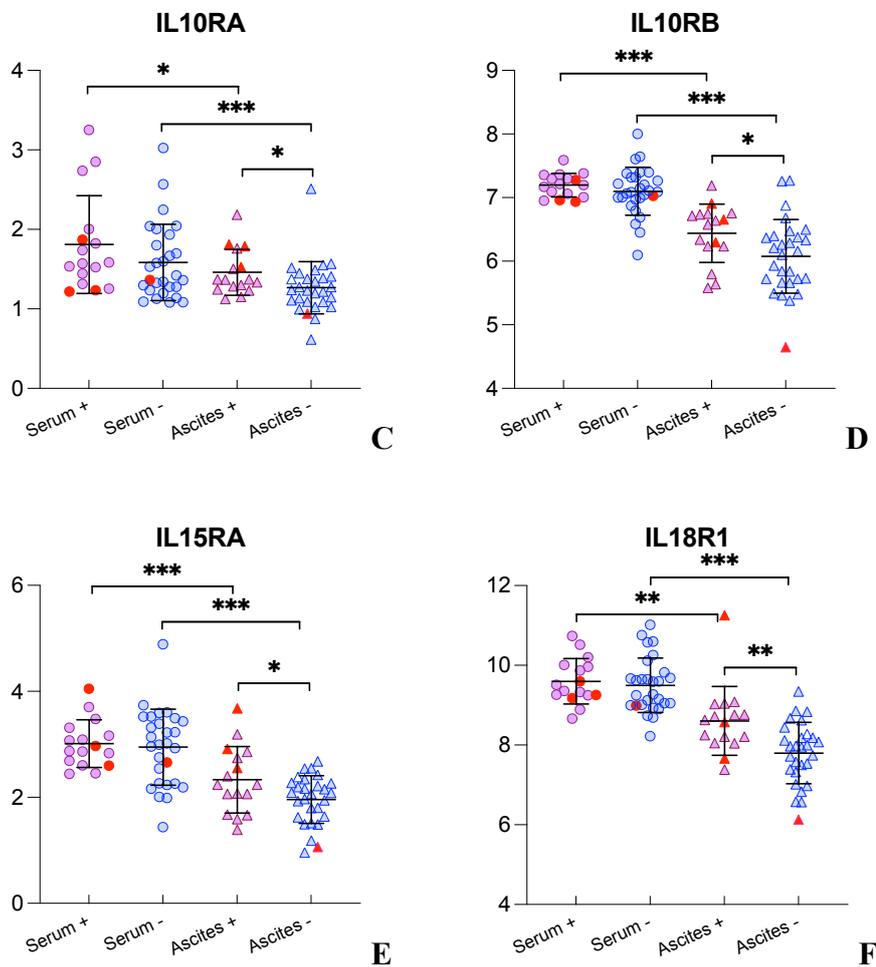


Abbildung 4.7: Signifikante immunologische Rezeptoren (2)

(C) Interleukin 10 receptor subunit alpha (IL10RA), (D) Interleukin 10 receptor subunit beta (IL10RB), (E) Interleukin 15 receptor subunit alpha (IL15RA), (F) Interleukin 18 receptor 1 (IL18R1)

Wie auch in der Gruppe der Interleukine zeigen sich unter den Interleukin-Rezeptoren hochsignifikante Differenzen in ihrem Vorkommen in Serum und Aszites sowie innerhalb des Aszites in signifikanter Abhängigkeit einer positiven Virusdiagnostik. So sind **IL10RA, IL 10RB, IL15RA und IL18R1** alle signifikant vermehrt im Serum zu messen (p-Werte siehe Tabelle 3.7). Außerdem fällt auf, dass sich eine positive Virusdiagnostik im Aszites auch signifikant auf eine vermehrte Konzentration der IL-Rezeptoren auswirkt:

IL10RA: $p= 0,0360$; MW $1,5 \pm 0,29$ (Virus +) versus MW $1,3 \pm 0,33$ (Virus -)

IL 10RB: $p= 0,0374$; MW $6,4 \pm 0,46$ (Virus +) versus MW $6,1 \pm 0,58$ (Virus -)

IL15RA: $p= 0,0275$; MW $2,3 \pm 0,63$ (Virus +) versus MW $2,0 \pm 0,45$ (Virus -)

IL18 R1: $p= 0,0024$; MW $8,6 \pm 0,86$ (Virus +) versus MW $7,8 \pm 0,77$ (Virus -)

Tabelle 4.7: Immunologische Rezeptoren (n=19)

Signifikanzen werden zwischen Aszites und Serum innerhalb der Subgruppen mit (+) und ohne (-) Virusnachweis dargestellt. Es werden außerdem Signifikanzen der Proteinexpression in Abhängigkeit einer positiven oder negativen Virusdiagnostik in den Kompartimenten Serum und Aszites getrennt voneinander dargestellt.

| Immunologische Rezeptoren | Vergleich Aszites vs. Serum | | Vergleich pos. und neg. Virusnachweis (+ vs. -) | |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------|---|-----------------|
| | Virus positiv (+) | Virus negativ (-) | Serum | Aszites |
| CD5 | 0,9399 | 0,0016** | 0,2496 | 0,0010** |
| CD6 | 0,0008*** | <0,0001*** | 0,6728 | 0,0124* |
| CD8 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,5495 | 0,7384 |
| CD40 | 0,0111* | 0,6260 | 0,3610 | 0,0084** |
| CD244 | 0,0017** | <0,0001*** | 0,1059 | 0,6939 |
| CDCP1 | 0,0001*** | 0,3826 | 0,1202 | 0,0051** |
| DNER | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,2171 | 0,3553 |
| IL10RA | 0,0250* | 0,0006*** | 0,2300 | 0,0360* |
| IL10RB | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,3427 | 0,0374* |
| IL15RA | 0,0008*** | <0,0001*** | 0,744 | 0,0275* |
| IL18R1 | 0,0027** | <0,0001*** | 0,6229 | 0,0024** |
| IL20RA | 0,029* | <0,0001*** | 0,9904 | 0,8564 |
| IL2RB | 0,0063** | <0,0001*** | 0,0407* | 0,5704 |
| IL2 | 0,7998 | 0,1204 | 0,9211 | 0,1313 |

| | | | | |
|---------|------------|------------|--------|--------|
| OPG | 0,0002*** | 0,1910 | 0,6124 | 0,0606 |
| PD-L1 | 0,0005*** | <0,0001*** | 0,9550 | 0,0755 |
| SLAMF1 | 0,0003*** | <0,0001*** | 0,2543 | 0,0615 |
| TNFRSF9 | 0,0250* | 0,0004*** | 0,1551 | 0,0650 |
| LIF-R | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,4763 | 0,4065 |

4.3.5 Chemokine

Insgesamt wurden 20 Chemokine analysiert, von denen 16 einen signifikanten Unterschied zwischen Aszites und Serum entweder mit positivem, negativem Virusnachweis oder in beiden Subgruppen aufwiesen.

Tabelle 4.8: Immunologische Rezeptoren (n=19)

Signifikanzen werden zwischen Aszites und Serum innerhalb der Subgruppen mit (+) und ohne (-) Virusnachweis dargestellt. Es werden außerdem Signifikanzen der Proteinexpression in Abhängigkeit einer positiven oder negativen Virusdiagnostik in den Kompartimenten Serum und Aszites getrennt voneinander dargestellt.

| Chemokine | Vergleich Aszites vs. Serum | | Vergleich pos. und neg. Virusnachweis (+ vs. -) | |
|---------------|--------------------------------|----------------------|--|---------------|
| | Virus positiv (+) | Virus negativ (-) | Serum | Aszites |
| CCL3 | 0,0076** | 0,8489 | 0,7184 | 0,1163 |
| CCL4 | 0,3755 | 0,0426* | 0,3515 | 0,6552 |
| CCL11 | 0,0006*** | <0,0001*** | 0,5032 | 0,0255* |
| CCL19 | 0,6200 | 0,2376 | 0,2333 | 0,1322 |
| CCL20 | 0,5587 | <0,0001*** | 0,4780 | 0,0171* |
| CCL23 | 0,0085** | 0,0751 | 0,1687 | 0,9551 |
| CCL25 | 0,0070** | <0,0001*** | 0,2837 | 0,5088 |
| CCL28 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,7262 | 0,0590 |
| CX3CL1 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,3624 | 0,9875 |
| CXCL1 | 0,0507 | 0,0001*** | 0,7084 | 0,4875 |
| CXCL5 | 0,0155* | <0,0001*** | 0,2825 | 0,1777 |
| CXCL6 | 0,5649 | 0,9553 | 0,0225* | 0,0810 |
| CXCL9 | 0,1608 | 0,4838 | 0,4867 | 0,5635 |
| CXCL10 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,0176* | 0,6905 |
| CXCL11 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,3908 | 0,5105 |
| IL8 | 0,1046 | 0,0774 | 0,4105 | 0,9279 |

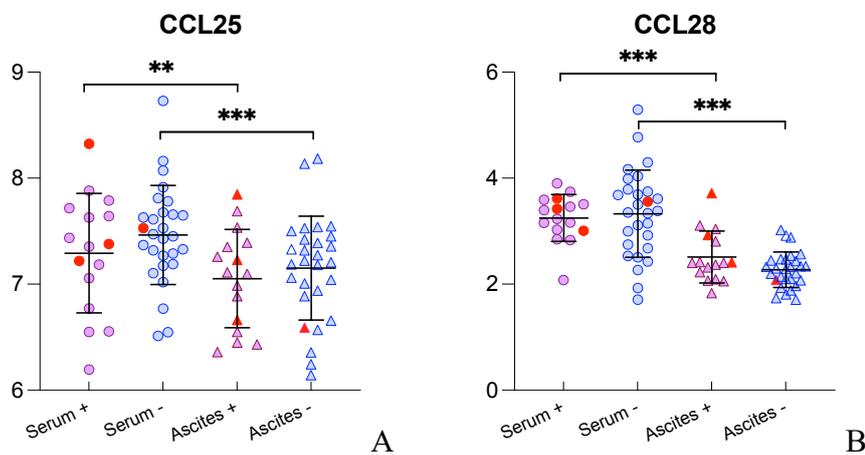
| | | | | |
|-------------|----------------------|----------------------|---------------|---------------|
| MCP1 | 0,0011** | 0,0005*** | 0,7669 | 0,2932 |
| MCP2 | 0,1297 | <0,0001*** | 0,6037 | 0,0727 |
| MCP3 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,6207 | 0,0901 |
| MCP4 | <0,0001*** | <0,0001*** | 0,6028 | 0,1052 |

Exemplarisch weisen **CCL25** und **CCL28** signifikant höhere Messungen im Serum auf als im Aszites.

Die Mittelwerte von CCL25 im Serum stehen mit $7,3 \pm 0,56$ (Virus +) und MW $7,5 \pm 0,47$ (Virus -) niedrigeren Mittelwerten im Aszites mit $7,1 \pm 0,46$ (Virus +) und $7,2 \pm 0,49$ (Virus -) gegenüber ($p=0,0070$ und $p<0,0001$). CCL28 ist mit p-Werten von je $<0,0001$ signifikant erhöht im Serum nachweisbar.

Weiterhin hochsignifikante Differenzen lassen sich in der **Gruppe der CXCL** mit p-Werten von je $<0,0001$ im Vergleich der Kompartimente Aszites und Serum beobachten sowie unter den **MCP 1-4**.

Eine von der positiven Virusdiagnostik abhängige Abweichung im Aszites kann lediglich bei CCL11 und CCL 20 belegt werden.



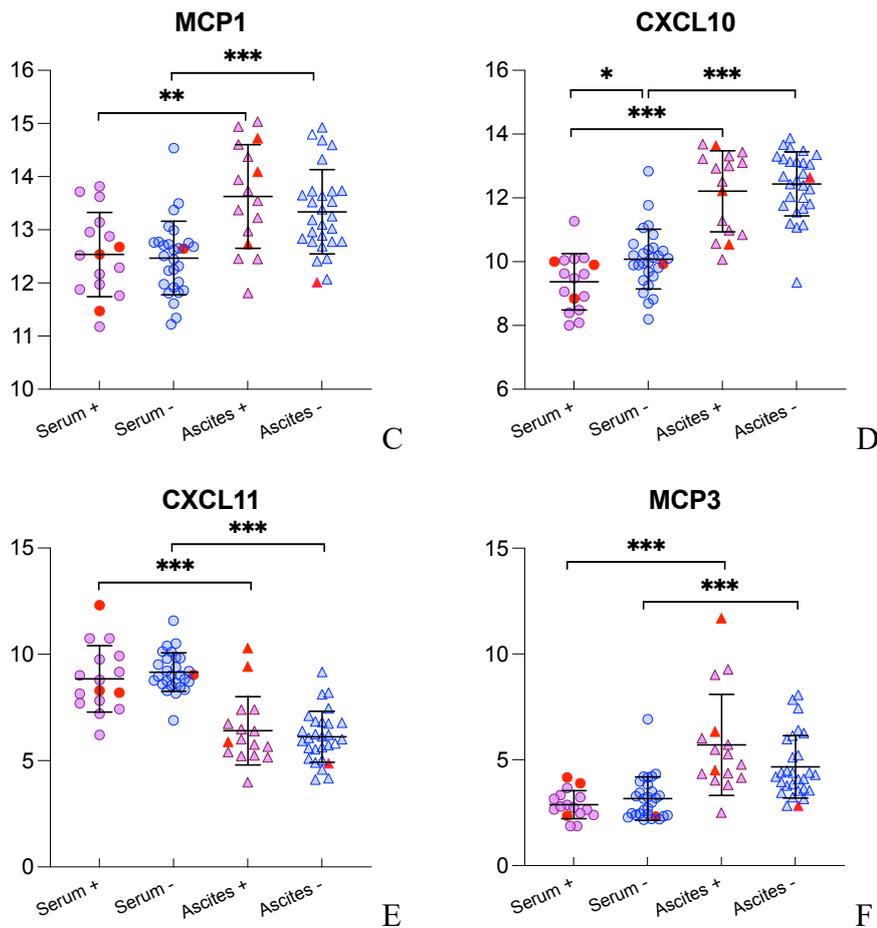


Abbildung 4.8: Signifikante Chemokine

(A) C-C motif chemokine 25 (CCL25), (B) C-C motif chemokine 28 (CCL28), (C) C-C motif chemokine 2 (MCP1), (D) C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), (E) C-X-C motif chemokine 11 (CXCL11), (F) C-C motif chemokine 7 (MCP3)

Biomarker aus Aszites und Serum von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n =16) und negativem (-, n =28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.4 Charakterisierung von Aszites und Serum als Kompartimente

Aus den unter 4.3 präsentierten immunologischen Profilen und ihren größtenteils hochsignifikanten Differenzen in Aszites und Serum lässt sich bereits eine Charakterisierung als eigenständige immunologische Kompartimente schlussfolgern.

Für eine weitere sinnvolle Reduktion und Interpretation des multidimensionalen Datensatzes erfolgte eine Principal Component Analysis (PCA), eine Lineartransformation zur Mustererkennung, wie unter Methoden näher beschrieben.

Insgesamt bestand die Subgruppe aller Patient:innen, von denen sowohl im Aszites als auch im Serum die Bestimmung von Proteinmarkern erfolgen konnte, aus 44 Patient:innen, woraus sich 183 Variablen ergeben. Die einzelnen Proteinmarker bilden in linearen Kombinationen die Varianzen, die die Hauptkomponenten erklären.

4.4.1 Das immunologische Profil von Serum und Aszites

In einem ersten Schritt wurden alle Proteinbiomarker aus Serum und Aszites ohne abhängiges Kriterium für eine erste Faktorenanalyse auf die Hauptkomponenten geladen.

Das visualisierte Cluster in Abbildung 4.9 ergibt sich aus der farblichen Kodierung aller Biomarker, die jeweils in beiden Kompartimenten (Aszites und Serum) gemessen wurden. Es zeigen sich zwei farblich homogene Ballungszentren, die die quantifizierten Enzyme im Aszites grafisch eindeutig von ihrem Äquivalent im Serum abgrenzen.

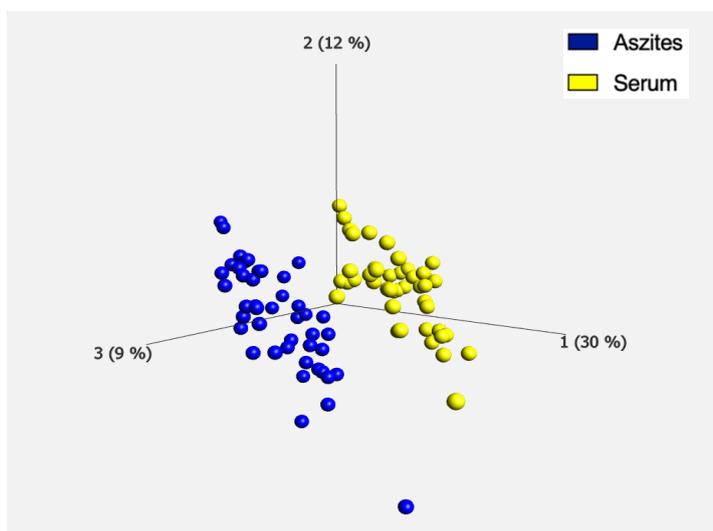


Abbildung 4.9: Immunologisches Profil der Kompartimente

Aszites (blau) und Serum (gelb) bei Leberzirrhosepatient:innen (n=44). Proteinbiomarker n=92. Die Achsen stellen die drei Hauptkomponenten und deren Gewichtung (Anteil der Streuung in der Stichprobe) in Prozent dar.

Weiterhin wurden anschließend die Variablen hinsichtlich eines Virusnachweises im Aszites aufgeschlüsselt und farblich gekennzeichnet in grün (negativ) und rot (positiv).

Die Ballungszentren von Aszites und Serum sind als immunologische Kompartimente strukturell unverändert abgrenzbar. Das virologische Farbcluster wird in Abbildung 4.10 dargestellt. Hier ist zunächst kein neues Profil erkennbar.

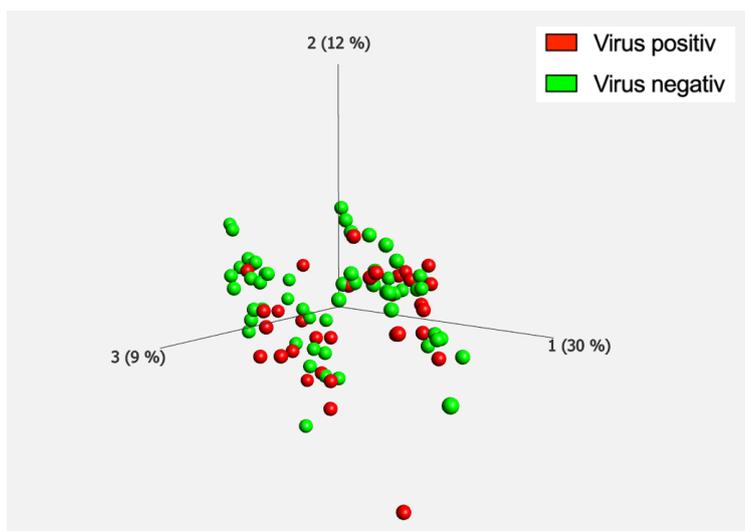


Abbildung 4.10: Immunologisches Profil in Abhängigkeit viraler DNA in Aszites und Serum bei Leberzirrhosepatient:innen (n=44).

Proteinbiomarker n=92. Positive virologische Befund (n=16) werden rot und negative Befunde (n=28) grün dargestellt. Die Achsen stellen die drei Hauptkomponenten und deren Gewichtung (Anteil der Streuung in der Stichprobe) in Prozent dar.

4.4.2 Das immunologische Aszitesprofil

Um das immunologische Profil im Aszites in Hinblick auf einen positiven Virusbefund näher beschreiben zu können, wurden im Folgenden alle aus dem Aszites gemessenen immunologischen Marker in eine PCA eingeschlossen ($p=1$). Nach farblicher Aufschlüsselung viruspositiver und -negativer Variablen war eine Struktur nicht deutlich abgrenzbar.

Mit einer weiteren Selektion wurden nur statistisch signifikante Variablen in die PCA eingeschlossen, die mit einem Signifikanzniveau von $p<0,05$ mit einem positiven

Virusbefund in Verbindung gebracht werden konnten. Der Vergleich der Profile ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

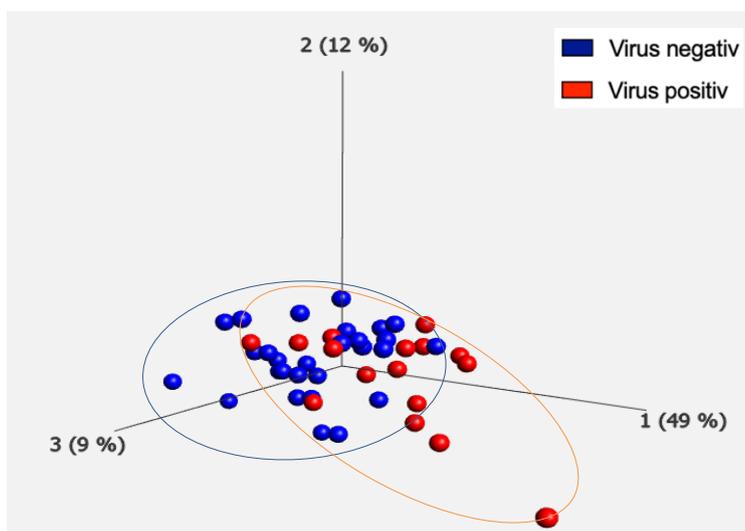


Abbildung 4.11: Immunologisches Clustering im Aszites

in Abhängigkeit von einem positiven (n=16, rot) oder negativen (n=28, blau) Virusbefund bei Leberzirrhosepatient:innen (n=44). Eingeschlossen wurden alle Bioproteine mit dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ (n=20). Die Achsen stellen die Hauptkomponente 1-3 und deren Gewichtung (Anteil der Streuung in der Stichprobe) in Prozent dar.

In die Exploration des Aszitesprofils in Abhängigkeit eines Virusnachweises mit Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden 20 Biomarker eingeschlossen, die in Tabelle 4.9 zusammengefasst werden.

Tabelle 4.9: Virusabhängig signifikante Biomarker (n=20) im Aszites mit $p < 0,05$.

| Immunologischer Biomarker | p-Wert | q-Wert |
|---------------------------|--------|--------|
| CD5 | 0.001 | 0.047 |
| VEGFA | 0.001 | 0.047 |
| ADA | 0.002 | 0.047 |
| IL-18R1 | 0.003 | 0.060 |
| CDCP1 | 0.004 | 0.073 |
| SCF | 0.005 | 0.080 |
| CD40 | 0.008 | 0.110 |
| CD6 | 0.012 | 0.138 |
| OSM | 0.016 | 0.138 |
| CCL20 | 0.017 | 0.138 |
| NT-3 | 0.017 | 0.138 |
| CSF-1 | 0.018 | 0.138 |
| LIF | 0.024 | 0.158 |

| | | |
|---------|-------|-------|
| CCL11 | 0.026 | 0.158 |
| EN-RAGE | 0.026 | 0.158 |
| IL-15RA | 0.028 | 0.158 |
| TNFSF14 | 0.037 | 0.191 |
| IL-10RB | 0.037 | 0.191 |
| IL7 | 0.040 | 0.193 |
| TNFRSF9 | 0.046 | 0.199 |

4.4.3 Das immunologische Serumprofil

Für einen Überblick über den Einfluss viraler Befunde im Aszites auf Entzündungsmuster im Serum rechneten wir zudem weitere Hauptkomponentenanalysen mit den immunologischen Variablen im Serum. Die Exploration umfasst die statistisch signifikanten Variablen $p < 0,05$.

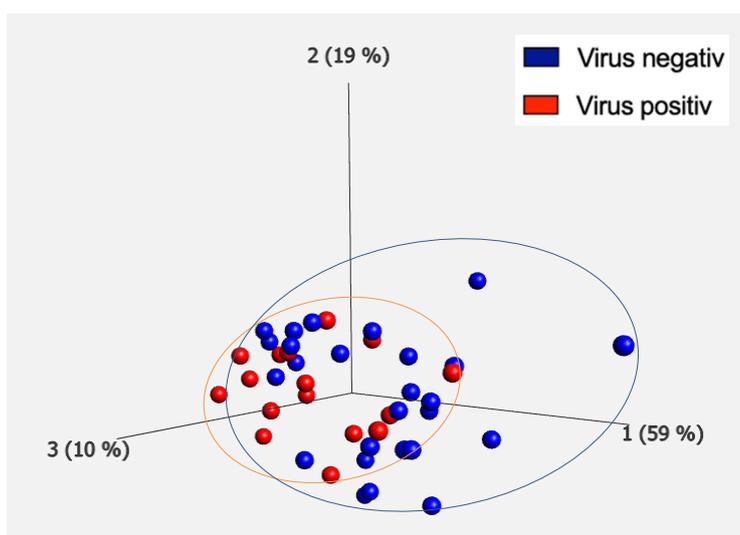


Abbildung 4.12: Immunologisches Clustering im Serum

in Abhängigkeit von einem positiven ($n=16$, rot) oder negativen ($n=28$, blau) Virusbefund bei Leberzirrhosepatient:innen ($n=44$). Eingeschlossen wurden alle Bioproteine mit dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ ($n=5$). Die Achsen stellen die Hauptkomponente 1-3 und deren Gewichtung (Anteil der Streuung in der Stichprobe) in Prozent dar.

In die Exploration der inflammatorischen Expression von Biomarkern im Serum mit signifikanter Abhängigkeit eines Virusnachweises im Aszites ($p < 0,05$) wurden 5 Biomarker eingeschlossen, die in Tabelle 4.10 dargestellt werden.

Tabelle 4.10: Signifikante Biomarker im Serum mit $p < 0,05$

| Variable annotation | p-value | q-value |
|----------------------------|----------------|----------------|
| TWEAK - Serum | 0.044 | 0.794 |
| MMP-1 - Serum | 0.043 | 0.794 |
| STAMPB - Serum | 0.036 | 0.794 |
| CXCL6 - Serum | 0.025 | 0.794 |
| CXCL10 - Serum | 0.023 | 0.794 |

4.5 Klinische Endpunkte

Die Exploration von viral getriggerten Inflammationsmustern wirft die Frage nach ihrer klinischen Relevanz für Patient:innen mit Leberzirrhose auf.

Um den Einfluss der virologischer Befunde auf die Krankheitsschwere der Studienpatient:innen zu evaluieren, prüften wir verschiedene klinische Endpunkte in Zusammenhang mit einem Virusnachweis im Aszites. Dabei wurde zwischen den einzelnen Virustypen aufgrund der geringen Populationsgröße von viruspositiven Patient:innen nicht differenziert, sondern lediglich ein Positiv- vs. Negativbefund im Aszites als Kriterium verwendet.

Die Endpunkte stellen ein oder mehrere Organversagen und Komplikationen des ACLV dar, wie in Tabelle 4.11 präsentiert. Mit einem positiven Virusnachweis allein kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Vorliegen eines ACLV ($p=0,139$) oder einzelner Organversagen nachgewiesen werden.

Tabelle 4.11: Auftretens von Komplikationen in Abhängigkeit eines Virusbefundes

| Endpunkte | Virusnachweis positiv (n=19) n (%) | Virusnachweis negativ (n=34) n (%) | Gesamt (n= 53) n (%) | p-Wert |
|--------------------|---|---|---------------------------------|---------------|
| ACLV gesamt | 7 (36,8) | 8 (23,5) | 15 (28,3) | 0, 139 |
| Grad 1, n (%) | 2 (15,8) | 3 (8,8) | 5 (9,4) | |
| Grad 2, n (%) | 3 (10,2) | 5 (14,7) | 8 (15,1) | |

| | | | | |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| Grad 3, n (%) | 2 (10,5) | 0 (0) | 2 (3,8) | |
| Organversagen | | | | |
| Leberversagen | 1 (5,3) | 4 (11,8) | 5 (9,4) | 0,437 |
| Nierenversagen | 6 (31,6) | 6 (17,6) | 12 (22,6) | 0,245 |
| Dialysepflicht | 2 (10,5) | 3 (8,8) | 5 (9,4) | 0,839 |
| Respiratorisches Versagen | 3 (15,3) | 1 (2,9) | 4 (7,5) | 0,089 |
| Gerinnungsversagen | 1 (5,3) | 1 (2,9) | 2 (3,8) | 0,671 |
| Kreislaufversagen | 4 (21,1) | 11 (32,4) | 15 (28,3) | 0,381 |
| Hepatische Enzephalopathie | 6 (31,6) | 4 (11,8) | 10 (18,9) | 0,142 |
| Grad 1, n (%) | 5 (26,3) | 4 (11,8) | 9 (17) | |
| Grad 2, n (%) | 1 (5,3) | 0 (0) | 1 (1,9) | |
| Grad 3, n (%) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | |
| Aszites | | | | 0,242 |
| Mittelgradig | 8 (42,1) | 20 (58,8) | 28 (52,8) | |
| Massiv | 11 (57,9) | 14 (41,2) | 25 (47,2) | |
| Intensivstation im Verlauf | 6 (31,6) | 14 (41,2) | 20 (37,7) | 0,489 |
| GI-Blutung | 2 (10,5) | 5 (15,2) | 7 (13,5) | 0,638 |

Unter Berücksichtigung der numerischen Differenz der Subgruppen (19 Patient:innen mit Virusnachweis vs. 34 Patient:innen ohne Virusnachweis) kann prozentual ein häufigeres Auftreten eines ACLV bei Patient:innen mit positivem Virusbefund festgestellt werden als in der Subgruppe mit dekompensierter Leberzirrhose ohne Multiorganversagen (in 36,8 % vs. 23,5%).

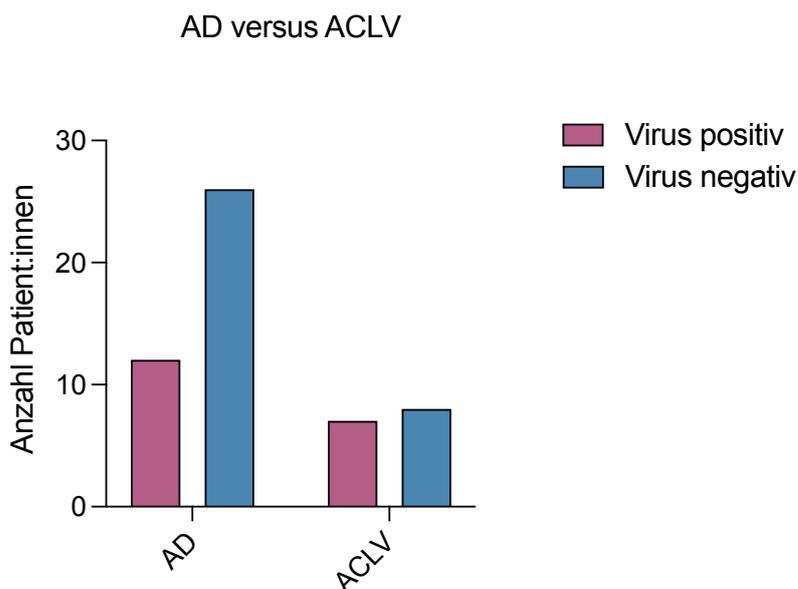


Abbildung 4.13: Virusbefund in Abhängigkeit von Krankheitsstadium

Grafische Darstellung aller Patient:innen mit positivem (n=19) und negativem (n=34) Virusbefund im Aszites in Abhängigkeit der Schwere der Erkrankung.

AD= Akute Dekompensation, ACLV= Akut-auf-chronisches Leberversagen (kumulativ Grad 1-3)

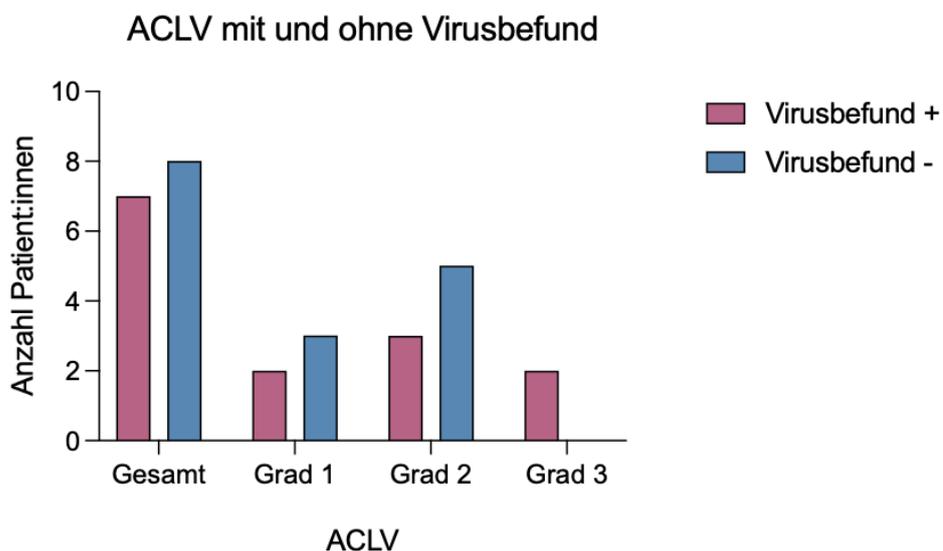


Abbildung 4.14: ACLV und Virusbefund

Grafische Darstellung aller Patient:innen mit positivem Virusbefund (n=19) im Aszites und ACLV nach Grad differenziert.

Auch ein Nierenversagen und ein respiratorisches Versagen kamen anteilig häufiger vor, wenn ein Virusbefund vorlag (31,6% vs. 17,6% und 15,3 vs. 2,9%). Eine hepatische Enzephalopathie entwickelten 31,6% in der viruspositiven Subgruppe und 11,8 % ohne Virusnachweis. Mit Auftreten von massivem Aszites gab es mehr positive Virusbefunde als bei mittelgradiger Ausprägung, wie in Abbildung 3.15 deutlich wird.

Andererseits wurden Patient:innen ohne Virusnachweis im Verlauf häufiger auf der Intensivstation behandelt und es trat öfter eine GI-Blutung auf. Insgesamt waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p>0,05$).

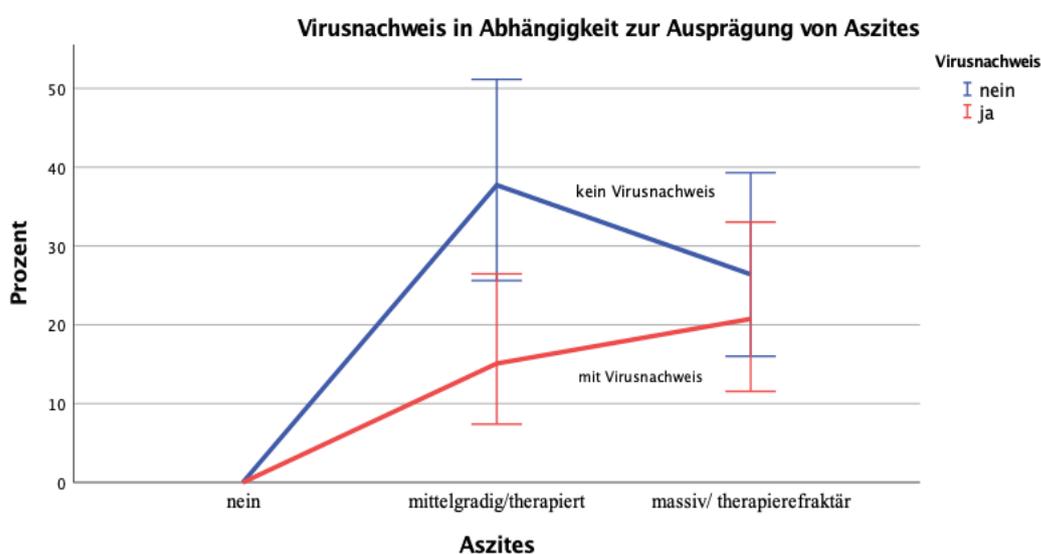


Abbildung 4.15: Virusnachweis in Abhängigkeit von Aszites

Graphische Darstellung von Virusnachweisen in Zusammenhang mit Ausprägung von Aszites mittels Liniendiagramm. Die Prozentpunkte werden durch Fehlerbalken ergänzt, die im 95% Konfidenzintervall liegen.

5 DISKUSSION

Für Patient:innen mit Leberzirrhose ist das ACLV eine lebensbedrohliche Komplikation, die mit einer Mortalität von 50% im 90-Tagesverlauf einhergeht und deren Pathogenese noch nicht hinreichend erforscht ist. Die auslösenden Faktoren für die systemische Inflammation mit oxidativem Stress bleiben in 40% der Fälle unklar. Neben intrahepatischen Faktoren wie Alkoholabusus, viralen Hepatitiden und Intoxikationen sind extrahepatische Auslöser wie operative Eingriffe, Blutungsereignisse und Infektionen als Ursache für ein ACLV zu benennen. Infektionen, besonders bakterielle Erreger, stellen die häufigste identifizierbare Ursache für eine Leberfunktionsverschlechterung dar, seltener auch Pilze. Als virale Trigger werden hauptsächlich hepatotrope Viren, insbesondere die Reaktivierung des Hepatitis B Virus, für ein Multiorganversagen verantwortlich gemacht (Arroyo et al., 2020).

Die Bedeutung viraler Infektionen jenseits der bekannten Virushepatitiden im Kontext eines ACLV ist bisher weitgehend unbekannt – dabei stellen Viren eine der häufigsten alltäglichen Infektionsquellen für Menschen dar. Der Ansatz, die immunpathologischen Entzündungsmuster einer chronischen Leberzirrhose vor dem Hintergrund explizit nicht-hepatotroper Viren als Trigger für eine mögliche Leberfunktionsverschlechterung zu beleuchten, stellte bis vor Beginn der COVID-Pandemie ein Novum dar.

5.1 Hauptergebnisse

Diese Dissertation präsentiert die Resultate unserer klinischen Kohortenstudie zur Rolle viraler Trigger im pathophysiologischen Prozess chronischer Lebererkrankungen im Endstadium.

Hierfür wurde das immunologische Profil von 53 Patient:innen mit akuter hepatischer Dekompensation sowie ACLV verglichen. Diese Profile umfassen die Auswertung von je 92 Bioproteinen, die mit Inflammationsreaktionen und immunpathologischen Prozessen assoziiert werden. Die Diagnostik wurde extern mittels PEA aus den Biomaterialien Aszites und Serum erstellt und durch uns ausgewertet und verglichen.

Es ergeben sich signifikant abweichende immunologische Entzündungsmuster in Aszites und Serum (in 78 von 92 Biomarkern, respektive in 84,8%). Sie identifizieren

intraperitonealen Aszites als eigenständiges immunologisches Kompartiment mit einem signifikant von der serologischen Immunantwort abweichenden inflammatorischen Profil.

Weiterhin identifizierten wir mittels qPCR-Nachweis 19 Patient:innen (35,9% der Studienpopulation) als Träger viraler DNA nicht-hepatotroper Erreger im Aszites. Hohe CT-Werte deuten auf niedrig-replikative Viruspersistenzen statt auf akute Infektionen hin.

Die positiven virologischen Befunde korrelieren trotzdem signifikant mit der Expression spezifischer inflammatorischer Proteine. Diese gezielte Immunantwort lässt die Existenz einer spontan viralen Peritonitis zumindest auf immunzellulärer Ebene vermuten. Die Überprüfung klinischer Endpunkte wie Laborparameter, Organversagen oder Krankheits-schwere ergaben keine signifikante Leberfunktionsverschlechterung im Kontext viraler Infektionen, weshalb die klinische Relevanz fraglich bleibt.

5.2 Methodendiskussion

Die Studienkohorte bildet sich aus der Aufnahmepopulation einer gastroenterologischen Universitätsklinik. Die Auswahl der Proband:innen erfolgte monozentrisch. Durch unsere Rekrutierung als universitärer Maximalversorger mit einem überregionalen Einzugsgebiet über einen mehrjährigen Zeitraum von 2018 bis 2021 betrachten wir die Kohorte als repräsentativ.

Die Populationsgröße unserer Kohorte ist mit 53 Patient:innen im Vergleich zu anderen Studien mit ähnlichem Bezug klein. Besonders die numerische Differenz der Subgruppen (ACLV n=15 und AD n=38) beeinflusst die statistische Aussagekraft und erschwert das Erreichen eines Signifikanzniveaus. Ein limitierender Faktor für die kleine Fallzahl und ungleiche Subgruppenverteilung ergab sich aus der geringeren Inzidenz eines ACLV gegenüber Studienteilnehmer:innen mit AD. Zudem geht das ACLV häufig mit schweren klinischen Symptomen wie Desorientierung und Bewusstseins Einschränkungen einher, die eine besondere Herausforderung an einen ethisch einwandfreien Studieneinschluss mit gesichertem Konsens (bspw. in Form von Einverständniserklärungen) bedeutete.

Die klinische und laborchemische Diagnostik der Leberzirrhose erfolgte im Rahmen der aktuellen Leitlinien und alle Maßnahmen zur Probenakquirierung können als Methodik nach Goldstandard betrachtet werden.

Durch den Ausschluss maligner Grunderkrankungen aus der Studienkohorte wurde sichergestellt, dass die Kausalität der virusabhängigen Entzündungsmuster nicht durch immunologische Prozesse verzerrt werden.

Mittels qPCR gelang in 19 Patient:innen ein qualitativer und quantitativer Nachweis viraler Genome im Aszites. Gerade bei immunkompromittierten Patient:innen ohne adäquate Immunantwort ist die PCR-Diagnostik der Antikörperbestimmung überlegen. Die Diagnose einer akuten oder chronischen Infektion sollte auf der Grundlage einer Standard-DNA-Hybridisierung oder quantitativer (Echtzeit-)PCR erfolgen, jedoch wird eine Kombination mit serologischen Tests für das spezifische IgG, IgM oder beides empfohlen (Bihari et al., 2013). Eine Differenzierung zwischen einer viralen Primärinfektion, einer Reaktivierung, einer Viruslatenz oder niedrig-replikativen persistierenden „Virusresten“ ist allein mittels qPCR aus dem Aszites, wie sie uns vorliegt, nicht möglich. Sehr wohl lässt sich aber ein viraler Trägerstatus feststellen. Dies wirkt sich auch auf unsere statistische Auswertung aus, in der wir lediglich eine nominale Differenzierung (positiver vs. negativer Virusnachweis) verwendeten.

Durch den Studieneinschluss von ausschließlich dekompenzierten Lebererkrankungen mit punktablem Aszites begründet sich auch, dass der Studie keine Kontrollgruppe aus Patient:innen mit kompensierter Zirrhose vorliegt. Unter Hinzunahme seröser und respiratorischer Infektionsquellen könnte eine gesündere Kontrollgruppe die klinische Relevanz der Viren als Trigger für Exazerbationen auch ohne ACLV verifizieren.

Zudem ist die fehlende mikrobiologische Differenzialdiagnostik bakterieller Infektionen unserer Studie als Limitierung zu nennen. Bakterielle Entzündungsmuster können von viralen Kausalitäten jenseits der von uns durchgeführten Diagnostik nicht abgegrenzt werden. Die Proband:innen wurden auf eine spontan bakterielle Peritonitis untersucht (SBP= polymorphkernige Granulozytenzahl $> 0,25\text{ng/ml}$). Eine standardisierte mikrobiologische PCR-Diagnostik von Aszites und Serum hätte jedoch zusätzlich eine wertvolle Ergänzung der Datenauswertung dargestellt.

Die Immunoassays aus Aszites und Serum wurden extern von der durch uns beauftragten Firma Olink® erstellt. Einen limitierenden Faktor für die Sensitivität und Spezifität von Multiplex-Immunoassays stellt die Kreuzreaktivität der Antikörper dar, die aufgrund einer unspezifischen Bindungsneigung entsteht. Proximity Extension Assays stellen eine Labormethode dar, die mittels PCR-Amplifikation zwei oder mehr DNA-markierte

Aptamere oder Antikörper verwenden, die an dasselbe Protein oder denselben Proteinkomplex binden. Die Hybridisierung von ausschließlich zusammenpassenden DNA-Paaren zur Erzeugung eines Amplikons sichert eine besonders hohe Sensitivität und Spezifität, da so Kreuzreaktionen vermieden werden können (Greenwood et al., 2015).

5.3 Ergebnisdiskussion

5.3.1 Virale Aszitesinfektionen bei Leberzirrhose

Unsere Virusdiagnostik mittels qPCR aus dem Aszites ergab 7 EBV-DNA Nachweise, 6 positive Parvovirus B19-Befunde, drei HHV-7 Infektionen, zwei Nachweise von je hCMV und HAdV sowie je einen positiven Befund mit HSV-1 und Parechovirus.

Damit konnten wir 35,9 % unserer Studienpopulation als Träger viraler DNA im Aszites identifizieren.

Die Zahl der EBV-Infektionen unseres Studienkollektivs (13, 2%) scheint repräsentativ im Vergleich mit größeren Studien zur durchschnittlichen Infektionsrate unter Patient:innen mit Leberzirrhose. Die Prävalenz unterschiedlicher Studien mit Kohortengrößen zwischen 100 und 300 lag zwischen 10% bis 23% (Gupta et al., 2015; Hu et al., 2019, 2018). Die Viruslasten unserer Ergebnisse mit CT-Werten zwischen 34,2 und 39,7 (Median $36,7 \pm \text{STD } 1,7$) lassen sich eher als chronisch geringfügig aktive oder latente Infektionen interpretieren, die ohne vollständige Viruseliminierung aufgrund einer Immunsuppression persistieren. Sie sollten allerdings als Risiko für eine endogene Reaktivierung betrachtet werden.

In der aktuellen Literatur findet man mehrere Studien, die den Einfluss von EBV und hCMV auf chronische Lebererkrankungen untersuchen: Eine retrospektive Studie von Hu et. al untersuchte Patient:innen mit HBV-ACLV und einer viralen Koinfektion mit hCMV oder EBV hinsichtlich deren Einflusses auf die Leberfunktion. Die Prävalenz unter 100 Patient:innen lag bei 23,0% für EBV-Nachweise und 5% hCMV. Als Risikofaktoren für eine hCMV-Infektion identifizierte die Studie einen geringen HBV-Wert von <1000 IU/ml sowie ein Alter über 60 Jahre für eine EBV-Infektion.

Mit einer EBV-Koinfektion war ein höherer Child-Pugh Score assoziiert, während hCMV-Infizierte mit geringeren ALT-Werten keine höhere Leberschädigung aufwiesen.

Dies könnte allerdings durch den potenziell niedrigreplikativen HBV-Status erklärt werden (Hu et al., 2018).

Eine separate retrospektiven Analyse desselben Erstautoren bestätigt die vermutete Leberfunktionsverschlechterung durch EBV-Infektionen unter Patient:innen mit Leberzirrhose: Damit einher gingen niedrigere Albuminspiegel und Albumin-Globulin-Verhältnisse sowie ein höherer Child-Pugh-Score und eine höhere Rate an ACLV ($p = 0,050$). Das Multiorganversagen stellte einen Risikofaktor für eine höhere Sterblichkeitsrate dar (Hu et al., 2019).

Eine große indische Studie zur retrospektiven Untersuchung von viralen Infektionen als Ursache für akute virale Hepatitiden (AVH) und ACLV fand neben hepatotropen Viren als Trigger für eine hepatische Dekompensation auch in 10,5% (31 von 295 Patient:innen) nicht-hepatotrope Viren, hCMV und EBV. Diese trugen signifikant häufiger zu Infektionen bei AVH als bei ACLV bei (29 vs. 2, $p=0,002$) (Gupta et al., 2015).

Auffällig ist die nachweisbare Parvovirus B19- DNA ($n=6$) als pädiatrisch relevanter Erreger der Ringelröteln in unserer erwachsenen Studienpopulation. Eine akute Infektion mit dem B19-Virus ist mit vielfältigen Haut-, Gelenk- und Lebermanifestationen assoziiert. Bei immunsupprimierten Patient:innen sollte eine aplastische Anämie ausgeschlossen werden. (Bihari et al., 2013). Die Kontaminationsrate der B19-Diagnostik ist hoch, daher empfiehlt sich neben einer PCR auch die Ermittlung von spezifischen Antikörpern (Bihari et al., 2013), die wir leider nicht vorweisen können. Die Viruslasten zwischen 37,8 und 39,5 (Median $38,9 \pm \text{STD } 0,66$) deuten nicht auf eine akute Infektion hin, lassen sich jedoch als niedrig-replikative persistierende „Virusreste“ interpretieren.

Parvovirus B19 hat mit einer Seroprävalenz von 72,1% in Deutschland ebenfalls eine hohe Durchseuchungsquote und kann als chronisch persistierende Infektion mit einer kontinuierlichen Virusproduktion vor allem in immungeschwächten Patient:innen auftreten und in der Leber replizieren (Pongratz et al., 2009; Wang et al., 2009).

Eine besondere Korrelation von B19-Viren oder deren Persistenz mit chronischen Lebererkrankungen haben auch andere Studien beobachtet:

Pongratz et al. berichtet in einem Case Report von einer viralen B19-Persistenz in einem gesunden Mann mit konsekutivem Auftreten einer chronischen Leberzellschädigung (Pongratz et al., 2009).

Unter 463 asiatischen Patient:innen mit HBV- assoziierter Lebererkrankung fand Toan et. al in 21,4% der Studienpopulation B19-DNA (n=99). Die Ko-Infektion trat signifikant häufiger auf als der B19- Nachweis in gesunden Kontrollpersonen ($p < 0,001$) und wurde als signifikanter Risikofaktor für das Fortschreiten zu einer schweren Leberschädigung identifiziert (Toan et al., 2006). In unserer Studienpopulation lässt sich wiederum kein gehäuftes Vorkommen des B19-Virus‘ explizit unter den HBV-Trägern feststellen.

Diese These der B19-Virus-assoziierten Leberzellschädigung wurde in einer europäischen Studie anhand von Patient:innen mit einer viralen Hepatitis (HBV/HCV) aufgegriffen. Sie bestätigt eine mögliche niedrig-replikative Viruspersistenz in der Leber über einen langen Zeitraum. Im Gegenzug zur asiatischen Studie konnte allerdings keine signifikante Verschlechterung der Leberfunktionen in Zusammenhang mit der Koinfektion nachgewiesen werden (Wang et al., 2009).

Weiterhin wurde in unserer Studienkohorte eine Aszitesprobe mit HSV-1 DNA diagnostiziert. In der Literatur werden HSV-Hepatitisen selten und meist in Kombination mit einer Immunsuppression beschrieben (Then et al., 2019).

HSV-DNA wurde ebenfalls bereits direkt in der Leber nachgewiesen. Die Pathogenese wird kontrovers diskutiert: Eine viszerale Dissemination in die Leber, entweder als Folge einer überstrapazierten Immunabwehr durch hohe Virusexposition oder aber durch herpetische Läsionen im Zuge beeinträchtigter Makrophagen, zytotoxischer T-Lymphozyten und einer verzögerten Hypersensitivität, wird diskutiert. Auch eine akute Superinfektion auf eine latente HSV-Reaktivierung wird als Trigger für das Organversagen vermutet. Bestimmte HSV-Stämme haben sich zudem als neurovirulent erwiesen, weshalb die vierte Theorie eine mögliche Hepatovirulenz vermutet (Kaufman et al., 1997; Miyazaki et al., 1991).

Ebenso selten wird eine hADV-induzierte Hepatitis in der Literatur beschrieben. Wir fanden zwei Nachweise von hAdV im Aszites unserer Proband:innen.

In allen Fällen eines schweren hepatologischen Verlaufs in Assoziation mit hADV wird eine Immunsuppression durch Leber- oder Stammzelltransplantation, eine hämatoonkologische Grunderkrankung oder Chemotherapie beschrieben (Zheng et al., 2022).

Einzelne kleine Studien und Fallbeispiele beschäftigen sich mit der Pathogenese: Am Mausmodell konnte nach iv.-Injektion hochdosierter (replikationsunfähiger) HAdV-Vektoren eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit disseminierter

intravaskulärer Gerinnung, Zytokinsturmsyndrom, Hepatotoxizität und Thrombozytopenie beobachtet werden. Insbesondere HAdV-C5-Vektoren sind hepatisch affin und akut lebertoxisch und können die Genese der HAdV-induzierten Hepatitis zumindest teilweise darstellen.

Alemanly et al. fanden zudem in Gewebemakrophagen der Leber große Mengen an Viruspartikeln, beispielsweise in Kupffer-Zellen. Diese aktivieren das proinflammatorische Zytokin IL-1 α und triggern die Ausschüttung von IL-1RI, TNF- α und IL-6 sowie der Chemokine CXCL2, CXCL1 und CCL2. 60 Minuten nach Injektion starben die Kupfferzellen nekrotisch ab und lösten eine systemische Entzündungsreaktion weiterer proinflammatorischer Mediatoren aus (Alemanly, Suzuki and Curiel, Kalyuzhniy et al., 2008; Smith et al., 2008; Zheng et al., 2022).

In unserem Immunoassay ist das proinflammatorische IL-1 α im Aszites signifikant höher in der viruspositiven Subgruppe exprimiert ($p=0,0459$). Die Enzymaktivität war zudem im viruspositiven Aszites signifikant höher messbar als im Serum.

Zu Bedenken gilt, dass lediglich zwei Proband:innen einen hAdV-DNA Nachweis im Aszites trugen. Da IL-1 α aber ein zentrales proinflammatorisches Zytokin ist, das in fast allen Zelltypen gefunden werden kann und bei nekrotischem Zelltod und Gewebeschäden als lokaler Entzündungsmediator exprimiert wird (Cavalli et al., 2021), gehen wir von einer Übertragbarkeit auf andere virale Erreger aus. Im Blutkreislauf wurde IL-1 α dagegen nur selten beobachtet, was mit unserer indifferenten Messung des Zytokins im Serum unter virusnegativen Patient:innen korreliert.

5.3.2 Immunologische Kompartimente

Von 92 Biomarkern, deren Aktivität in Aszites und Serum mittels Proximity Extension Assay (PEA) quantifiziert wurde, unterscheiden sich 78 Enzyme statistisch signifikant in ihrer Expression in Aszites und Serum.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) stellt eine zweckmäßige und unvoreingenommene Methode dar, aus hochdimensionalen Datensätzen Strukturen oder Modi zu extrahieren und ggf. redundante Informationen zu entfernen. Sie stellt eine Art datengesteuerten Filter dar, der variante Eigenschaften koordinieren kann (Daffertshofer et al., 2004).

Das mittels PCA visualisierte Cluster in Abbildung 4.9 aus Proteinbiomarkern (n=92) unserer Studienkohorte (n=44) zeigt zwei separate Datenballungszentren, die die Biomaterialien Aszites und Serum als individuelle Kompartimente voneinander abgrenzen. Insbesondere systemische Entzündungsprozesse laufen serologisch vermittelt über zelluläre und humorale Immunreaktionen ab. Unsere Daten identifizieren darüber hinaus intraperitonealen Aszites als eigenständiges Kompartiment mit spezifischem immunologischen Expressionsmuster. Immunpathologische Vorgänge im Aszites wurden bereits im Kontext der spontan bakteriellen Peritonitis sowie in Hinblick auf kanzeröse Prozesse untersucht (Atta et al., 2021; Zeni et al., 1993). Hier zeigten sich signifikante Differenzen einzelner Biomarker wie IL-2 und IL-10 in ihrer Expression im Aszites versus Serum. Die Zytokinkonzentration in der Aszitesflüssigkeit war den serösen Messungen im Kontext mit einem HCC prognostisch sogar überlegen. Diesen Effekt konnten wir in unseren Ergebnissen dahingehend verifizieren, dass nicht nur einzelne, sondern fast 85% (78 von 92) der von uns quantifizierten immunologischen Biomarker einen individuellen immunologischen Fußabdruck in beiden Kompartimenten auszeichnen.

Um mögliche immunologische Variablen in Abhängigkeit von viralen Infektionen zu extrahieren und visualisieren, wurde die Expression aller Bioproteine nach Patient:innen mit viraler DNA im Aszites aufgeschlüsselt: Es zeigte sich kein abgegrenztes Muster.

Dies entspricht unserem immunologischen Profiling, in dem 20 der Biomarker statistisch signifikant durch den Nachweis viraler DNA im Aszites exprimiert werden und lediglich 5 Enzyme im Serum.

Mit der Auswahl dieser statistisch signifikanten Biomarker im Aszites jedoch, formieren sich die virusnegativen und -positiven Messungen grafisch eindeutig zu einem individuellen immunologischen Expressionsprofil.

Obwohl das Muster gut abgrenzbar ist, überlappen die Cluster einander teilweise und deuten darauf hin, dass der zu erwartende Effekt unserer Studie, respektive die viral getriggerten Differenzen immunologischer Biomarkeraktivität, im Kontext der Studiengröße klein bleibt.

Für einen Gruppenvergleich verschiedener Merkmale ist der notwendige Studienumfang von der Größe des zu erwartenden Effekts abhängig. Dieser ist durch das relative Risiko, das Quotenverhältnis, die Hazard Ratio oder die Differenz zwischen Mittelwerten und

Medianen quantifizierbar. Der Nachweis einer kleiner erwarteten Effektgröße erfordert also eine größere Studie (Hackshaw, 2008).

Auch im Serum führten wir zu dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ eine Clusteranalyse aller viral assoziierten Proteine durch. Hier zeigte sich ebenfalls eine Tendenz. Zu bedenken gilt allerdings, dass nur 5 Biomarker statistisch signifikante Differenzen im Kontext viraler Nachweise im Aszites aufwiesen und diese keine akuten Infektionen darstellen. Dies zeigt zwar einerseits, dass eine Translokation lokaler Entzündungsprozesse zu systemischen Immunantworten bereits bei geringsten Mengen persistierender DNA gegeben ist, diese allerdings sehr spezifisch und auf wenige Immunmodulatoren limitiert verläuft. Über den systemischen Effekt einer akuten Infektion mit serös zirkulierenden Wirtszellen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

5.3.3 Viral getriggerte Immunreaktionen und klinische Endpunkte

Die Interpretation aller 92 pro- und antiinflammatorischer Proteinbiomarker sprengt den Rahmen dieser Dissertation. Es soll jedoch eine erste Einordnung der statistisch signifikanten Biomarker in den Kontext einer viral getriggerten zellulären Immunreaktion mit Blick auf den aktuellen Stand der Forschung erfolgen.

Im Aszites weisen insgesamt 20 der von uns quantifizierten 92 Biomarker eine virusabhängige Aktivität in Patient:innen mit fortgeschrittener Leberzirrhose auf.

In Patient:innen mit dekompensierter Zirrhose und ACLV liegt eine systemische Entzündungsreaktion vor, die mit dem Schweregrad der Erkrankung zunimmt. Dieser pathophysiologische Vorgang zeichnet sich durch eine dysregulierte Immunantwort mit oxidativem Zellstress aus. Die dysregulierte Produktion von Chemokinen wie IL-8, MCP-1 und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-6 geht mit einer parallel unzureichenden Entzündungshemmung einher, wie etwa durch IL-10 und IL-1RA (Clària et al., 2016b).

In Assoziation dazu beobachteten wir in unserer Studienkohorte eine signifikant erhöhte Aktivität der proinflammatorischen Zytokine EN-RAGE, IL1-a, IL12B und TNFSF14 im Aszites viruspositiver Patient:innen im Vergleich zur virusnegativen Kontrollgruppe.

Die Relevanz dieser spezifischen zellulären Immunantwort untersuchen mehrere Studien mit viruspositiven COVID-19 Patient:innen, welche dieselbe Immunantwort auf die Covid-Infektion beobachtet haben, die auch für das ACLV typisch ist: Ein

proinflammatorischer Zytokinsturm mit hohen Werten von IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL10/IP10, Makrophagen-Entzündungsprotein 1 alpha (MIP-1 α) und CCL2 (Arunachalam et al., 2020; Elhence et al., 2021; Ramasamy and Subbian, 2021).

Arunachalam et al. beobachteten im Detail erhöhte Plasmakonzentrationen der Entzündungsmediatoren IL-6, TNF, sowie EN-RAGE, TNFSF14 und Oncostatin M, welche mit dem Schweregrad der Erkrankung sowie erhöhten bakteriellen Produkten im Plasma korrelieren. Zum Vergleich wurden auch Patient:innen mit Influenza und dem respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) herangezogen, deren Zytokinaktivität mit Ausnahme von TNFSF14 ebenfalls erhöht war (Arunachalam et al., 2020). Während die Autoren einen (zusätzlichen) bakteriellen Trigger für den Zytokinsturm in seiner viruspositiven Studienkohorte vermuten, lassen unsere direkt virusabhängigen Vergleiche einen ähnlichen Mechanismus für Viren vermuten.

So aktiviert TNFSF14 beispielsweise als Eintrittsmediator für Herpesviren proinflammatorische oder inhibitorische Signalwege (Ware and Šedyó, 2011).

Die Immunkaskade von IL-1a als zentrale proinflammatorische Zytokinantwort auf virale Erreger wurde im Kontext einer hAdV-Hepatitis in Kapitel 5.3.1 bereits kurz umrissen. Während sich die gesteigerte Enzymaktivität dieser proinflammatorischen Biomarker in den Kontext virusassoziierter Pathomechanismen einreicht, verbleiben die Zytokine TNF und IL6 sowie auch der virusassoziierte Immunrezeptor CD8 in unserer Studie ohne statistische Relevanz.

Die Expression von Adenosine Deaminase (ADA) ist in viruspositivem Aszites signifikant höher exprimiert als ohne Virusnachweis. Zudem stellten wir signifikant höhere Serum- als Asziteslevel fest.

Die enzymatische Reaktion von ADA auf infektiöse Erreger, welche vor allem Makrophagen zum Ziel haben, ist durch Erkrankungen wie Tuberkulose, Typhus und HIV erforscht. Auch ein Zusammenhang zwischen einer signifikant erhöhten ADA-Expression und viralen Hepatitiden (A, B, C, D, E) wurde untersucht. Die erhöhte ADA-Aktivität spiegelt vermutlich die phagozytotische Makrophagenaktivität wider (Kalkan et al., 1999).

Auch nicht-hepatotrope Virusinfektionen triggern eine erhöhte ADA-Aktivität: Bei 104 Kindern mit infektiöser Mononukleose maß der ADA-Spiegel signifikant höher im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe. Der Marker korrelierte stark mit der

Lymphozytenanzahl und den CD3+CD8+ T-Zellen. Darüber hinaus wurde ADA als ein Prädiktor für erhöhte Alanin-Transaminasen identifiziert (Shi et al., 2022).

Von einer gewissen Übertragbarkeit auf (nicht-hepatotrope) virale Infektionen im Setting chronischer Lebererkrankungen ist auszugehen, sodass ADA nicht nur durch virale Infektionen höher exprimiert wird, sondern hierdurch auch eine indirekte Leberzellschädigung vermutet werden kann.

CCL11 und CCL20 weisen als Chemokine ebenfalls signifikant höhere Konzentrationen in viruspositiven als negativen Aszitesmaterial auf. In einer aktuellen Studie von Wong et al. wurde CCL11 mit einem Anstieg der Lebersteifigkeit bei Patient:innen mit chronischer HBV-Infektion und NAFDL in Verbindung gebracht, wobei ein Anstieg von CCL11 um eine Einheit mit einem Anstieg des LSM-Scores (Liver Stiffness Score im Fibro-Scan) verbunden war. Allerdings nennt die Studie auch IL-13 als zweiten und maßgeblichen unabhängigen Faktor für das Fortschreiten einer Leberzirrhose bei metabolischem Syndrom und chronischer Virusentzündung, welches in unseren Ergebnissen nicht signifikant verändert war (Wong et al., 2021).

Darüber hinaus ist die Rolle von CCL11 und CCL20 in unserem Kontext in der aktuellen Literatur noch nicht diskutiert worden.

Die Interleukin-Rezeptoren IL10RA, IL10RB, IL15RA und IL18R1 werden in viruspositivem Aszites signifikant höher exprimiert als in negativen Proband:innen. Als Rezeptoren für IL-10 sind IL10RA und IL10RB am inflammatorischen Progress der viralen getriggerten HCV-Zirrhose beteiligt (Hennig et al., 2007). Die Aktivität von IL10 unterscheidet sich auch in unseren Ergebnissen hochsignifikant in Serum und Aszites, allerdings konnten wir keine virusabhängigen Differenzen innerhalb des Aszites finden.

Andere immunologische Rezeptoren wie CD5, CD6 und CD40 zeigen ebenfalls eine viruspezifische Aktivität im Aszites. Sie fungieren als Oberflächenantigene von Lymphozyten, die auf Immunzellen exprimiert werden.

Während CD5 als Regulator der Immuntoleranz in seiner Aktivität sowohl hochregulierend als auch suppressiv wirkt (Raman, 2002), wurde eine erhöhte CD6-Aktivität im Maus-Modell mit einer früheren Reaktion auf bakterielle Erreger assoziiert (Català et al., 2022).

5.3.4 Zusammenfassung

Positive Virusbefunde im Aszites ließen sich nachweisen in 19 von 53 Patient:innen (35,9%).

Gleichzeitig korreliert die quantitative Expression von 25 immunmodulierenden Biomarker in Aszites und/oder Serum signifikant mit dem Nachweis einer viralen DNA im Aszites.

Der Vergleich der immunologischen Entzündungsmuster im Aszites mit und ohne viralen Infektionen sprechen dafür das Phänomen einer viral getriggerten Immunreaktion, die im Setting einer aszitisch dekompensierten Leberzirrhose als spontan viralen Peritonitis interpretiert werden kann.

Eine solche aszitische Virusinfektion konnte von uns allerdings nicht statistisch signifikant mit einem häufigeren Vorkommen eines ACLV in Zusammenhang gebracht werden. In Hinblick auf die uns vorliegenden hohen CT-Werte (MW zwischen 26,39 und 39,12) der viralen DNA gehen wir eher von einer niedrig-replikative Viruslatenz als von akuten viralen Infektionen aus, was wiederum die erwartete klinische Relevanz beeinträchtigt.

Berücksichtigt man die numerische Differenz der Subgruppen, zeigen sich prozentual allerdings vermehrte Komplikationen im Sinne eines ACLV sowie folgender (Organ-) Komplikationen unter den viruspositiven Patient:innen:

Nierenversagen ohne oder mit Dialysepflichtigkeit, respiratorisches Versagen, Gerinnungsversagen, HE sowie Auftreten von massivem Aszites.

Wir vermuten, dass hierzu die statistische Aussagekraft der relativ kleinen Studienkohorte mit sehr heterogenen Virusinfektionen und einer ungleichen Subgruppengröße zwischen AD und ACLV limitiert ist. So ist beispielsweise auch die Leukozytenkonzentration und der Inflammationsmarker CRP im Vergleich zwischen AD und ACLV nicht statistisch signifikant, obwohl dies zu erwarten gewesen wäre (Studienvergleich mit Moreau et al., 2013). Eine weitere Hypothese, die aus dieser Beobachtung resultiert, stellt die Frage, ob jenseits von akuten Infektionen auch durchgemachte Erkrankungen mit einer Viruslatenz das Immunsystem nachhaltig verändern, sodass intraperitoneale Entzündungsmuster bei chronisch leberkranken Menschen verändert bleiben und inwieweit sie systemische Entzündungsreaktionen begünstigen.

Es ist denkbar, dass die Translokation von peritonealen viralen Entzündungsprozessen nicht zwangsläufig zu einer systemischen Multiorganreaktion führen muss. Nur 5 der

quantifizierten 92 Entzündungsmarker zeigten mit einem aszitischen Virusnachweis auch eine serologisch messbare Immunaktivierung (MMP1, STAMBP1, TWEAK, IL2RB, CCL11, CCL20). Folgerichtig ließ sich in der PC-Analyse aller Proteinbiomarker kein deutliches systemisches Entzündungsmuster anhand einer aszitischen Virusinfektion abgrenzen und das Cluster der signifikanten Proteine (n=5) bleibt von limitierter Aussagekraft.

5.4 Limitationen und Ausblick

Die bedeutendste Limitation unserer Studie ist die Größe unserer Studienkohorte. Für den Gruppenvergleich unserer Merkmale ist der gegebene Studienumfang angesichts der vermuteten Größe des zu erwartenden Effekts klein. Dies wird auch durch das relative Risiko, das Quotenverhältnis, die Hazard Ratio oder die Differenz zwischen Mittelwerten und Medianen quantifizierbar. Der Nachweis unserer (kleiner) erwarteten Effektgröße erfordert also eine größere Studie (Hackshaw, 2008). Zudem lassen die uns vorliegenden niedrigen CT-Werte der viralen DNA eher auf niedrig-replikative Virusreste schließen, als auf akute Infektionen, was wiederum den erwarteten klinischen Effekt abermals reduziert.

Kleine Studien können allerdings wertvolle Impulse für größere Bestätigungsstudien geben.

Der Einbezug mehrerer Infektionsquellen (wie beispielsweise respiratorisches, seröses und fäkales Biomaterial) und eine Kontrollgruppe in einem kompensierten Krankheitsstadium wäre in Nachfolgeuntersuchungen eine wertvolle Ergänzung zur Beurteilung der klinischen Relevanz viraler Infektionen für leberkranke Patient:innen.

Zusätzlich wäre eine mikrobiologische Differenzierung bakterieller Infektionen sinnvoll, um ihren Einfluss auf zelluläre Immunreaktionen von viralen Kausalitäten abgrenzen zu können.

Während die spontan bakterielle Peritonitis ein bekannter und häufiger Auslöser für eine Leberfunktionsverschlechterung ist, weisen die immunologischen Entzündungsmuster im Aszites unserer Studienkohorte darauf hin, dass auch virale Infektionen pathophysiologische Mechanismen einer Leberfunktionsverschlechterung triggern.

Eine klinisch bezogene Relevanz für Endpunkte wie ein vermehrtes Auftreten von Organversagen konnten wir mit dieser Studie nicht beweisen. Auch bleibt die Frage offen, ob ausschließlich akute virale Infektionen ein ACLV begünstigen, oder sogar vergangene durchgemachte Virusinfektionen und latente Viruspersistenzen einen immunmodulatorischen Risikofaktor für einen schwereren Verlauf darstellen.

Weiterführende Studien sollten deshalb einen idealerweise multizentrisch organisierten Ansatz mit großem Patient:innenkollektiv verfolgen, um die vorliegenden Ergebnisse zu validieren und differenzieren.

Dann könnte ein genaueres Verständnis der Immunkaskade im pathophysiologischen Entstehungsprozess eines ACLV zu prophylaktischen Maßnahmen wie Impfempfehlungen und Vermeidungsstrategien beitragen. Auch direkte immunmodulatorische Therapieansätze wie beispielsweise hochdosierte Gaben von IL-22 sind vielversprechend.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Akut-auf-chronische Leberversagen (ACLV) ist ein klinisches Syndrom mit akuter Dekompensation (AD) der Leber und raschem (Multi-)Organversagen sowie hoher Kurzzeitmortalität. In über 40% der Fälle bleibt die Genese unklar. Neben intrahepatischen Mechanismen sind als extrahepatische Auslöser vor allem bakterielle Infektionen erforscht. Über nicht-hepatotrope Viren als Auslöser eines ACLV ist bisher wenig bekannt. Das Ziel unserer Studie stellte dementsprechend die Charakterisierung viral bedingter immunpathologischer Entzündungsmuster im Kontext einer Leberzirrhose mit nicht-hepatotropen Viren als potenzielle Auslöser eines ACLV dar.

Unsere Studienpopulation (n=53) chronisch leberkranker Patient:innen klassifizierten wir hierzu in zwei Subgruppen (AD, n= 35 versus ACLV, n=18).

Virale DNA nicht-hepatotroper Erreger konnte in 35,9% aller Proband:innen im Aszites nachgewiesen werden. Für die Charakterisierung der individuellen Entzündungsmuster erfolgte je Patient:in die Bestimmung von 92 pro- und antiinflammatorischen Proteinbiomarkern mittels Proximity Extension Assay (PEA) aus dem Aszites und Serum.

Im Vergleich der immunologischen Profile von Aszites und Serum unterschieden sich über 84% der Biomarker signifikant ($p < 0,05$) in ihrer quantitativen Expression. Damit identifizieren wir intraperitonealen Aszites als eigenständiges immunologisches Kompartiment mit spezifischen immunreaktiven Eigenschaften.

Mit positivem Virusnachweis korrelierten weitere 20 immunmodulierende Proteine im Aszites signifikant ($p = 0,001$ bis $p = 0,046$) mit einer spezifischen Immunantwort. Die viral getriggerte Entzündungsreaktion kann im Setting einer aszitisch dekompensierten Leberzirrhose zumindest auf immunzellulärer Ebene als spontan virale Peritonitis (SVP) interpretiert werden. Einen damit einhergehenden höheren Krankheitswert (häufigeres Auftreten eines ACLV) konnten wir statistisch jedoch nicht untermauern.

Unsere Befunde bestätigen in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur die Hypothese, dass auch nicht-hepatotrope Viren an der Immunpathogenese chronischer Lebererkrankungen beteiligt sind und spezifische inflammatorische Reaktionen triggern. Die klinische Konsequenz bleibt ungeklärt. Große multizentrische Studien sind gefragt, diese These zu differenzieren.

ABSTRACT

Acute-on-chronic liver failure (ACLF) is a clinical syndrome with acute decompensation (AD) of the liver and rapid (multi-)organ failure as well as high short-term mortality. Its genesis remains unclear in more than 40% of cases. In addition to intrahepatic mechanisms, bacterial infections have been identified as extrahepatic triggers. Little is known about non-hepatotropic viruses as triggers of ACLF.

Accordingly, the aim of our study was to characterize viral-induced inflammatory patterns in the context of liver cirrhosis and as potential triggers of ACLF.

For this purpose, we classified our study population (n=53) of patients with chronic liver disease into two subgroups (AD, n= 35 versus ACLF, n=18).

Viral DNA of non-hepatotropic pathogens was detected in ascites in 35.9% of all subjects. For the characterization of individual inflammatory patterns, 92 pro- and anti-inflammatory protein biomarkers were determined from ascites and serum by proximity extension assay (PEA).

Comparing the immunological profiles of ascites and serum, over 84% of the biomarkers differed significantly ($p < 0.05$) in their quantitative expression. Thus, intraperitoneal ascites was identified as a distinct immunological compartment with specific immunoreactive properties.

With positive viral detection, another 20 immunomodulatory proteins in ascites correlated significantly ($p = 0.001$ to $p = 0.046$) with a specific immune response. In the setting of ascitic decompensated liver cirrhosis, the inflammatory reaction triggered by viral pathogens can be interpreted as spontaneous viral peritonitis (SVP) at least on the immune cellular level. However, we were not able to statistically prove an association with higher disease value (more frequent occurrence of ACLF).

Our findings come along with up-to-date literature and confirm our hypothesis that viruses are involved in the immunopathogenesis of chronic liver diseases and trigger specific inflammatory reactions. The clinical consequence remains unclear. Large multicenter studies are needed to further evaluate this thesis.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Albillos, A., Lario, M., Álvarez-Mon, M., 2014. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 61, 1385–1396.
2. Alemany, R., Suzuki, K., Curiel, D.T., 2000. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *Journal of General Virology* 81, 2605–2609.
3. Alukal, J.J., Naqvi, H.A., Thuluvath, P.J., 2022. Vaccination in Chronic Liver Disease: An Update. *J Clin Exp Hepatol* 12, 937–947.
4. Arroyo, V., Jalan, R., 2016. Acute-on-Chronic Liver Failure: Definition, Diagnosis, and Clinical Characteristics. *Semin Liver Dis* 36, 109–116.
5. Arroyo, V., Moreau, R., Jalan, R., 2020. Acute-on-Chronic Liver Failure. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1914900> 382, 2137–2145.
6. Arroyo, V., Moreau, R., Kamath, P.S., Jalan, R., Ginès, P., Nevens, F., Fernández, J., To, U., García-Tsao, G., Schnabl, B., 2016. Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. *Nat Rev Dis Primers* 2, 1–18.
7. Artru, F., Louvet, A., Ruiz, I., Levesque, E., Labreuche, J., Ursic-Bedoya, J., Lassailly, G., Dharancy, S., Boleslawski, E., Lebuffe, G., Kipnis, E., Ichai, P., Coilly, A., de Martin, E., Antonini, T.M., Vibert, E., Jaber, S., Herrero, A., Samuel, D., Duhamel, A., Pageaux, G.P., Mathurin, P., Saliba, F., 2017. Liver transplantation in the most severely ill cirrhotic patients: A multicenter study in acute-on-chronic liver failure grade 3. *J Hepatol* 67, 708–715.
8. Arunachalam, P.S., Wimmers, F., Mok, C.K.P., Perera, R.A.P.M., Scott, M., Hagan, T., Sigal, N., Feng, Y., Bristow, L., Tsang, O.T.Y., Wagh, D., Coller, J., Pellegrini, K.L., Kazmin, D., Alaaeddine, G., Leung, W.S., Chan, J.M.C., Chik, T.S.H., Choi, C.Y.C., Chuerta, H., McCullough, M.P., Lv, H., Anderson, E., Edupuganti, S., Upadhyay, A.A., Bosinger, S.E., Terry, H., Khatri, P., Roupael, N., Peiris, M., Pulendran, B., 2020. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* (1979) 369, 1210–1220.
9. Atta, S., Kamel, M., Mansour, W., Hussein, T., Maher, K., Elrefaiy, M.A., 2021. Ascitic Fluid Cytokines in Chronic Liver Disease: A Possible Prognostic Tool. *Dig Dis* 39, 534–539.

10. Bihari, C., Rastogi, A., Saxena, P., Rangegowda, D., Chowdhury, A., Gupta, N., Sarin, S.K., 2013. Parvovirus B19 Associated Hepatitis. *Hepat Res Treat* 2013, 1–9.
11. Bunchorntavakul, C., Reddy, K.R., 2020. Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections of the Liver. *Gastroenterol Clin North Am* 49, 331–346.
12. Català, C., Velasco-de Andrés, M., Leyton-Pereira, A., Casadó-Llombart, S., Sáez Moya, M., Gutiérrez-Cózar, R., García-Luna, J., Consuegra-Fernández, M., Isamat, M., Aranda, F., Martínez-Florensa, M., Engel, P., Mourglia-Ettlin, G., Lozano, F., 2022. CD6 deficiency impairs early immune response to bacterial sepsis. *iScience* 25.
13. Cavalli, G., Colafrancesco, S., Emmi, G., Imazio, M., Lopalco, G., Maggio, M.C., Sota, J., Dinarello, C.A., 2021. Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 20.
14. Cholongitas, E., Papatheodoridis, G. v., Vangeli, M., Terreni, N., Patch, D., Burroughs, A.K., 2005. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther* 22, 1079–1089.
15. Choudhary, N.S., Dhampalwar, S., Saraf, N., Soini, A.S., 2021. Outcomes of COVID-19 in Patients with Cirrhosis or Liver Transplantation. *J Clin Exp Hepatol* 11, 713–719.
16. Clària, J., Stauber, R.E., Coenraad, M.J., Moreau, R., Jalan, R., Pavesi, M., Amorós, À., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Oetl, K., Morales-Ruiz, M., Angeli, P., Domenicali, M., Alessandria, C., Gerbes, A., Wendon, J., Nevens, F., Trebicka, J., Laleman, W., Saliba, F., Welzel, T.M., Albillos, A., Gustot, T., Benten, D., Durand, F., Ginès, P., Bernardi, M., Arroyo, V., Melero, P.A., Bañares, R., Bocci, M., Caraceni, P., Catalina, M.V., Chin, J.L., Concepción, M., Coilly, A., Deulofeu, C., Elkrief, L., Fernandez, J., Gola, E., de Gottardi, A., Grønbæk, H., Hausen, A.K., Lohse, A.W., Maggioni, C., Markwardt, D., Martinez, J., de la Mata, M., McCormick, P.A., Mesonero, F., Álvarez, J.L.M., Mookerjee, R.P., Moreno, C., Morrell, B., Mortensen, C., Peck-Radosavljevic, M., Risso, A., Samuel, D., Simon-Talero, M., Solà, E., Solis-Muñoz, P., Soriano, G., Sperl, J., Spindelboeck, W., Valla, D., Vargas, V., van Vlierberghe, H., Vogel, W., Wege, H., Willars, C., Zaccherini, G., Zeuzem, S., 2016a. Systemic

- inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* 64, 1249–1264.
17. Clària, J., Stauber, R.E., Coenraad, M.J., Moreau, R., Jalan, R., Pavesi, M., Amorós, À., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Oetl, K., Morales-Ruiz, M., Angeli, P., Domenicali, M., Alessandria, C., Gerbes, A., Wendon, J., Nevens, F., Trebicka, J., Laleman, W., Saliba, F., Welzel, T.M., Albillos, A., Gustot, T., Benten, D., Durand, F., Ginès, P., Bernardi, M., Arroyo, V., Melero, P.A., Bañares, R., Bocci, M., Caraceni, P., Catalina, M.V., Chin, J.L., Concepción, M., Coilly, A., Deulofeu, C., Elkrief, L., Fernandez, J., Gola, E., de Gottardi, A., Grønbæk, H., Hausen, A.K., Lohse, A.W., Maggioni, C., Markwardt, D., Martinez, J., de la Mata, M., McCormick, P.A., Mesonero, F., Álvarez, J.L.M., Mookerjee, R.P., Moreno, C., Morrell, B., Mortensen, C., Peck-Radosavljevic, M., Risso, A., Samuel, D., Simon-Talero, M., Solà, E., Solis-Muñoz, P., Soriano, G., Sperl, J., Spindelboeck, W., Valla, D., Vargas, V., van Vlierberghe, H., Vogel, W., Wege, H., Willars, C., Zaccherini, G., Zeuzem, S., 2016b. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* 64, 1249–1264.
 18. Daffertshofer, A., Lamoth, C.J.C., Meijer, O.G., Beek, P.J., 2004. PCA in studying coordination and variability: a tutorial. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 19, 415–428.
 19. Elhence, A., Vaishnav, M., Biswas, S., Chauhan, A., Anand, A., Shalimar, 2021. Coronavirus disease-2019 (Covid-19) and the liver. *J Clin Transl Hepatol* 9, 247–255.
 20. Esper, R.C., Bustos, E.P., Arroyo, S.O., Saavedra, J.A., Uribe, M., 2010. Liver involvement in severe human influenza A H1N1. *Ann Hepatol* 9, 107–111.
 21. Giannelli, V., di Gregorio, V., Iebba, V., Giusto, M., Schippa, S., Merli, M., Thalheimer, U., 2014. Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 20, 16795–16810.
 22. Greenwood, C., Ruff, D., Kirvell, S., Johnson, G., Dhillon, H.S., Bustin, S.A., 2015. Proximity assays for sensitive quantification of proteins. *Biomol Detect Quantif* 4, 10–16.
 23. Gupta, E., Ballani, N., Kumar, M., Sarin, S.K., 2015. Role of non-hepatotropic viruses in acute sporadic viral hepatitis and acute-on-chronic liver failure in adults. *Indian Journal of Gastroenterology* 34, 448–452.

24. Gustot, T., Fernandez, J., Garcia, E., Morando, F., Caraceni, P., Alessandria, C., Laleman, W., Trebicka, J., Elkrief, L., Hopf, C., Solís-Munoz, P., Saliba, F., Zeuzem, S., Albillos, A., Benten, D., Montero-Alvarez, J.L., Chivas, M.T., Concepción, M., Córdoba, J., McCormick, A., Stauber, R., Vogel, W., de Gottardi, A., Welzel, T.M., Domenicali, M., Risso, A., Wendon, J., Deulofeu, C., Angeli, P., Durand, F., Pavesi, M., Gerbes, A., Jalan, R., Moreau, R., Ginés, P., Bernardi, M., Arroyo, V., 2015. Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology* 62, 243–252.
25. Hackshaw, A., n.d. Small studies: strengths and limitations.
26. Hennig, B.J., Frodsham, A.J., Hellier, S., Knapp, S., Yee, L.J., Wright, M., Zhang, L., Thomas, H.C., Thursz, M., Hill, A. v., 2007. Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int* 27, 1134–1143.
27. Hernaez, R., Solà, E., Moreau, R., Ginès, P., 2017. Acute-on-chronic liver failure: An update. *Gut* 66, 541–553.
28. Hu, J., Zhang, X., Yu, G., Cai, H., Gu, J., Hu, M., Xiang, D., Lian, J., Yu, L., Jia, H., Zhang, Y., Yang, Y., 2019. Epstein-Barr virus infection is associated with a higher Child-Pugh score and may predict poor prognoses for patients with liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol* 19.
29. Hu, J., Zhao, H., Lou, D., Gao, H., Yang, M., Zhang, X., Jia, H., Li, L., 2018. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections, risk factors, and their influence on the liver function of patients with acute-on-chronic liver failure. *BMC Infect Dis* 18.
30. Iavarone, M., Ambrosio, R.D. ', Soria, A., Invernizzi, P., Bonfanti, P., Lampertico, P., 2020. High rates of 30-day mortality in patients with cirrhosis and COVID-19 Graphical abstract.
31. Jalan, R., Pavesi, M., Saliba, F., Amorós, A., Fernandez, J., Holland-Fischer, P., Sawhney, R., Mookerjee, R., Caraceni, P., Moreau, R., Ginès, P., Durand, F., Angeli, P., Alessandria, C., Laleman, W., Trebicka, J., Samuel, D., Zeuzem, S., Gustot, T., Gerbes, A.L., Wendon, J., Bernardi, M., Arroyo, V., Melero, P.A., Albillos, A., Banares, R., Benten, D., Bocci, M., Catalina, M.V., Chin, J.L., Coenraad, M.J., Concepción, M., Coilly, A., Dorn, L., Deulofeu, C., Elkrief, L., Garcia, E., Gatta, A., Gerber, L., de Gottardi, A., Graupera, I., Grønbæk, H., Hausen, A., Hopf, C., Karlsen, S., Lohse, A.W., Maggioli, C., Markwardt, D., Martinez, J., Marzano, A., de La Mata

- García, M., McCormick, P.A., Mesonero, F., Montero Álvarez, J.L., Mookerjee, R.P., Morando, F., Moreno, C., Morrell, B., Mortensen, C., Nevens, F., Peck-Radosavljevic, M., Pereira, G., Risso, A., Rizzetto, M., Romano, A., Sauerbruch, T., Simon-Talero, M., Solà-Vergés, E., Solis-Muñoz, P., Soriano, G., Sperl, J., Spindelboeck, W., Stauber, R., Steib, C., Valla, D., Verbeke, L., van Vlierberghe, H., Vogel, W., Wege, H., Welzel, T., Willars, C., Baenas, M.Y., Zaccherini, G., 2015. The CLIF Consortium Acute Decompensation score (CLIF-C ADs) for prognosis of hospitalised cirrhotic patients without acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 62, 831–840.
32. Jolliffe, I.T., Cadima, J., n.d. Principal component analysis: a review and recent developments.
33. Kalkan, A., Bulut, V., Erel, O., Avci, S., Kemal Bingol, N., n.d. Adenosine Deaminase and Guanosine Deaminase Activities in Sera of Patients with Viral Hepatitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 383–386.
34. Kalyuzhniy, O., di Paolo, N.C., Silvestry, M., Hofherr, S.E., Barry, M.A., Stewart, P.L., Shayakhmetov, D.M., 2008. Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5483–5488.
35. Kamath, P.S., Wiesner, R.H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T.M., Kosberg, C.L., D'amico, G., Dickson, E.R., Kim, W.R., 2001. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 33, 464–470.
36. Kaufman, B., Gandhi, S.A., Louie, E., Rizzi, R., Illei, P., 1997. © 1997 by The University of Chicago. All rights reserved. *Clinical Infectious Diseases* 24, 334–342.
37. Lange, C.M., Moreau, R., 2018. Immunodysfunction in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Visc Med* 34, 276–282.
38. Li, F., Thuluvath, P.J., 2021. EASL-CLIF criteria outperform NACSELD criteria for diagnosis and prognostication in ACLF. *J Hepatol* 75, 1096–1103.
39. Limon-De La Rosa, N., Cervantes-Alvarez, E., Navarro-Alvarez, N., 2022. Increased Hepatic Expression of SARS-CoV-2 Entry Points and Proinflammatory Cytokines in Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 20, 239-241.e3.
40. Miyazaki, Y., Akizuki, S., Sakaoka, H., Yamamoto, S., Terao, H., 1991. Disseminated infection of herpes simplex virus with fulminant hepatitis in a healthy adult. *APMIS* 99, 1001–1007.

41. Mogensen, T.H., 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev* 22, 240.
42. Moon, A.M., Webb, G.J., Aloman, C., Armstrong, M.J., Cargill, T., Dhanasekaran, R., Genescà, J., Gill, U.S., James, T.W., Jones, P.D., Marshall, A., Mells, G., Perumalswami, P. v., Qi, X., Su, F., Ufere, N.N., Barnes, E., Barritt, A.S., Marjot, T., 2020. High mortality rates for SARS-CoV-2 infection in patients with pre-existing chronic liver disease and cirrhosis: Preliminary results from an international registry. *J Hepatol* 73, 705–708.
43. Moreau, R., Gao, B., Papp, M., Bañares, R., Kamath, P.S., 2021. Acute-on-chronic liver failure: A distinct clinical syndrome. *J Hepatol* 75, S27–S35.
44. Moreau, R., Jalan, R., Gines, P., Pavesi, M., Angeli, P., Cordoba, J., Durand, F., Gustot, T., Saliba, F., Domenicali, M., Gerbes, A., Wendon, J., Alessandria, C., Laleman, W., Zeuzem, S., Trebicka, J., Bernardi, M., Arroyo, V., 2013. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 144.
45. Our PEA technology - Olink [WWW Document], n.d. URL <https://olink.com/our-platform/our-pea-technology/> (accessed 11.29.22).
46. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., Fallowfield, J.A., 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 14, 181–194.
47. Pongratz, G., Lindner, J., Modrow, S., Schimanski, S., Schö Lmerich, J., Fleck, & M., n.d. Persistent parvovirus B19 infection detected by specific CD4+ T-cell responses in a patient with hepatitis and polyarthritis.
48. Pugh, R.N.H., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., Williams, R., 1973. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 60, 646–649.
49. Raman, C., 2002. CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance. *Immunol Res* 26, 255–263.
50. Ramasamy, S., Subbian, S., 2021. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 34.
51. Sarin, S.K., Choudhury, A., 2016. Acute-on-chronic Liver Failure. *Curr Gastroenterol Rep* 18.

52. Shafran, N., Issachar, A., Shochat, T., Shafran, I.H., Bursztyn, M., Shlomai, A., 2021. Abnormal liver tests in patients with SARS-CoV-2 or influenza - prognostic similarities and temporal disparities. *JHEP Rep* 3.
53. Shi, T., Li, J., Miao, Y., Huang, L., Tian, J., 2022. Adenosine deaminase as a marker for the severity of infectious mononucleosis secondary to EBV in children. *BMC Infect Dis* 22.
54. Smith, J.S., Xu, Z., Tian, J., Stevenson, S.C., Byrnes, A.P., 2008. Interaction of systemically delivered adenovirus vectors with kupffer cells in mouse liver. *Hum Gene Ther* 19, 547–554.
55. Then, E.O., Gayam, V., Are, V.S., Sunkara, T., Gaduputi, V., 2019. Herpes Simplex Virus Hepatitis: A Brief Review of an Oft-overlooked Pathology. *Cureus*.
56. Toan, N.L., Song, L.H., Kremsner, P.G., Duy, D.N., Binh, V.Q., Duechting, A., Kaiser, H., Torresi, J., Kandolf, R., Bock, C.T., 2006. Co-infection of human parvovirus B19 in Vietnamese patients with hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 45, 361–369.
57. Tsochatzis, E.A., Bosch, J., Burroughs, A.K., 2014. Liver cirrhosis. *Lancet* 383, 1749–1761.
58. Tsoris, A., Marlar, C.A., 2022. Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease. *StatPearls*.
59. van Kerkhove, M.D., Cooper, M.J., Cost, A.A., Sanchez, J.L., Riley, S., 2015. Risk factors for severe outcomes among members of the United States military hospitalized with pneumonia and influenza, 2000–2012. *Vaccine* 33, 6970–6976.
60. Wang, C., Heim, A., Schlaphoff, V., Suneetha, P. v., Stegmann, K.A., Jiang, H., Krueger, M., Fytily, P., Schulz, T., Cornberg, M., Kandolf, R., Manns, M.P., Bock, C.T., Wedemeyer, H., 2009. Intrahepatic long-term persistence of parvovirus B19 and its role in chronic viral hepatitis. *J Med Virol* 81, 2079–2088.
61. Ware, C.F., Šedyó, J.R., 2011. TNF Superfamily Networks: Bidirectional and interference pathways of the herpesvirus entry mediator (TNFSF14). *Curr Opin Immunol* 23, 627–631.
62. Wiesner, R., Edwards, E., Freeman, R., Harper, A., Kim, R., Kamath, P., Kremers, W., Lake, J., Howard, T., Merion, R.M., Wolfe, R.A., Krom, R., Colombani, P.M., Cottingham, P.C., Dunn, S.P., Fung, J.J., Hanto, D.W., McDiarmid, S. v., Rabkin,

- J.M., Teperman, L.W., Turcotte, J.G., Wegman, L.R., 2003. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 124, 91–96.
63. Wong, S.W., Ting, Y.W., Yong, Y.K., Tan, H.Y., Barathan, M., Riazalhosseini, B., Bee, C.J., Tee, K.K., Larsson, M., Velu, V., Shankar, E.M., Mohamed, R., 2021. Chronic inflammation involves CCL11 and IL-13 to facilitate the development of liver cirrhosis and fibrosis in chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Clin Lab Invest* 81, 147–159.
64. Zaccherini, G., Weiss, E., Moreau, R., 2021. Acute-on-chronic liver failure: Definitions, pathophysiology and principles of treatment. *JHEP Reports* 3.
65. Zeni, F., Tardy, B., Vindimian, M., Comtet, C., Page, Y., Cusey, I., Bertrand, J.C., 1993. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the ascitic fluid of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 17, 218–223.
66. Zheng, N., Wang, Y., Rong, H., Wang, K., Huang, X., 2022. Human Adenovirus Associated Hepatic Injury. *Front Public Health* 10, 878161.
67. Zou, B., Yeo, Y.H., Jeong, D., Sheen, E., Park, H., Nguyen, P., Hsu, Y.C., Garcia, G., Nguyen, M.H., 2018. Higher mortality and hospital charges in patients with cirrhosis and acute respiratory illness: a population-based study. *Sci Rep* 8.

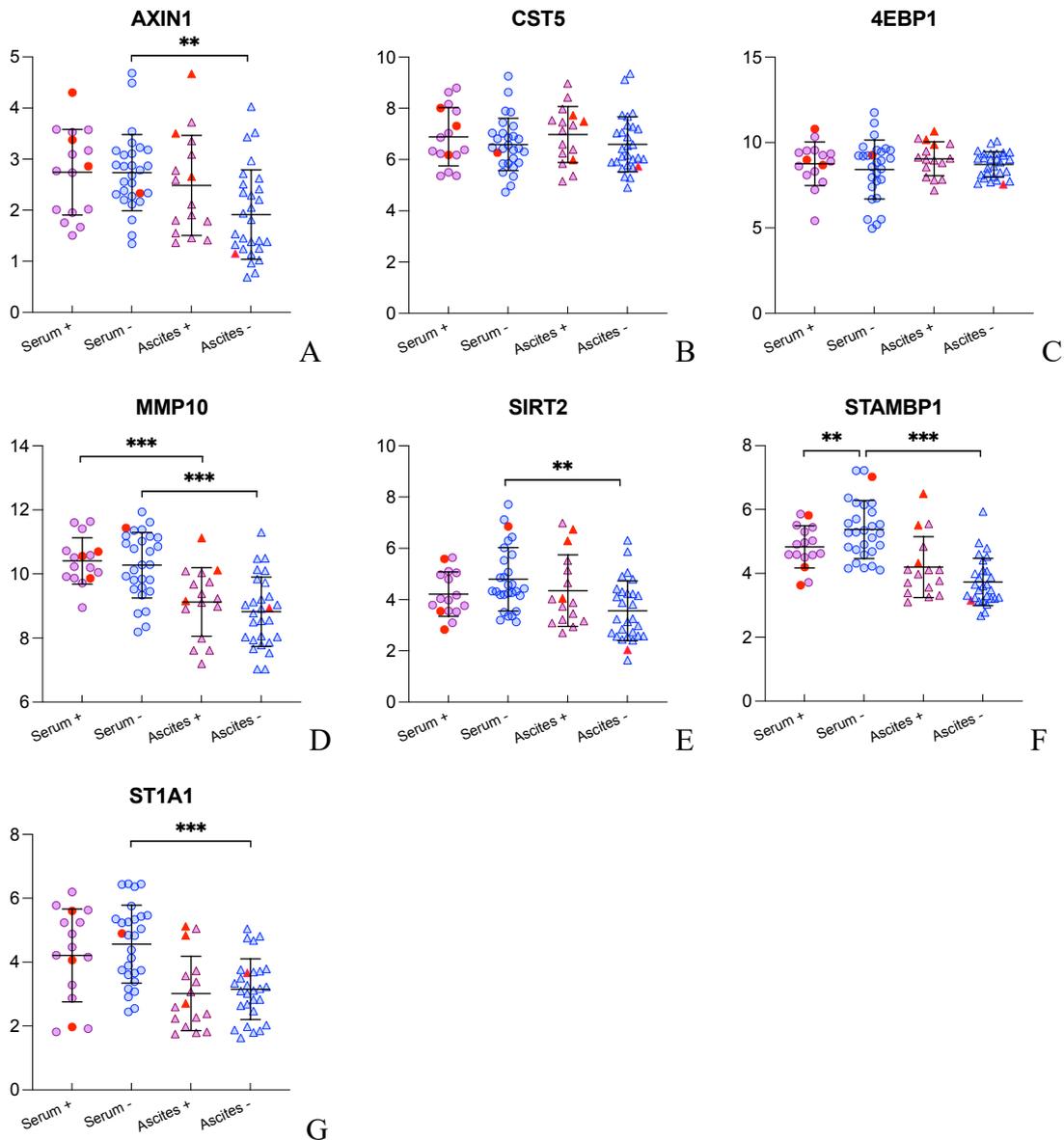
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Diagnostik einer AD und eines ACLV..... | 7 |
| Abbildung 3.1: Studiendesign | 20 |
| Abbildung 4.1: Prozentuale Verteilung von AD und ACLV | 33 |
| Abbildung 4.2: Verteilung aller Virusbefunde mit DNA-Nachweis im Aszites..... | 38 |
| Abbildung 4.3: Signifikante Signalproteine und Enzyme..... | 40 |
| Abbildung 4.4: Signifikante Wachstumsfaktoren | 43 |
| Abbildung 4.5: Signifikante Interleukine und Zytokine..... | 47 |
| Abbildung 4.6: Signifikante immunologische Rezeptoren (1)..... | 49 |
| Abbildung 4.7: Signifikante immunologische Rezeptoren (2)..... | 50 |
| Abbildung 4.8: Signifikante Chemokine | 54 |
| Abbildung 4.9: Immunologisches Profil der Kompartimente | 55 |
| Abbildung 4.10: Immunologisches Profil in Abhängigkeit viraler DNA in Aszites und Serum bei Leberzirrhosepatient:innen (n=44)..... | 56 |
| Abbildung 4.11: Immunologisches Clustering im Aszites..... | 57 |
| Abbildung 4.12: Immunologisches Clustering im Serum | 58 |
| Abbildung 4.13: Virusbefund in Abhängigkeit von Krankheitsstadium..... | 61 |
| Abbildung 4.14: ACLV und Virusbefund | 61 |
| Abbildung 4.15: Virusnachweis in Abhängigkeit von Aszites..... | 62 |

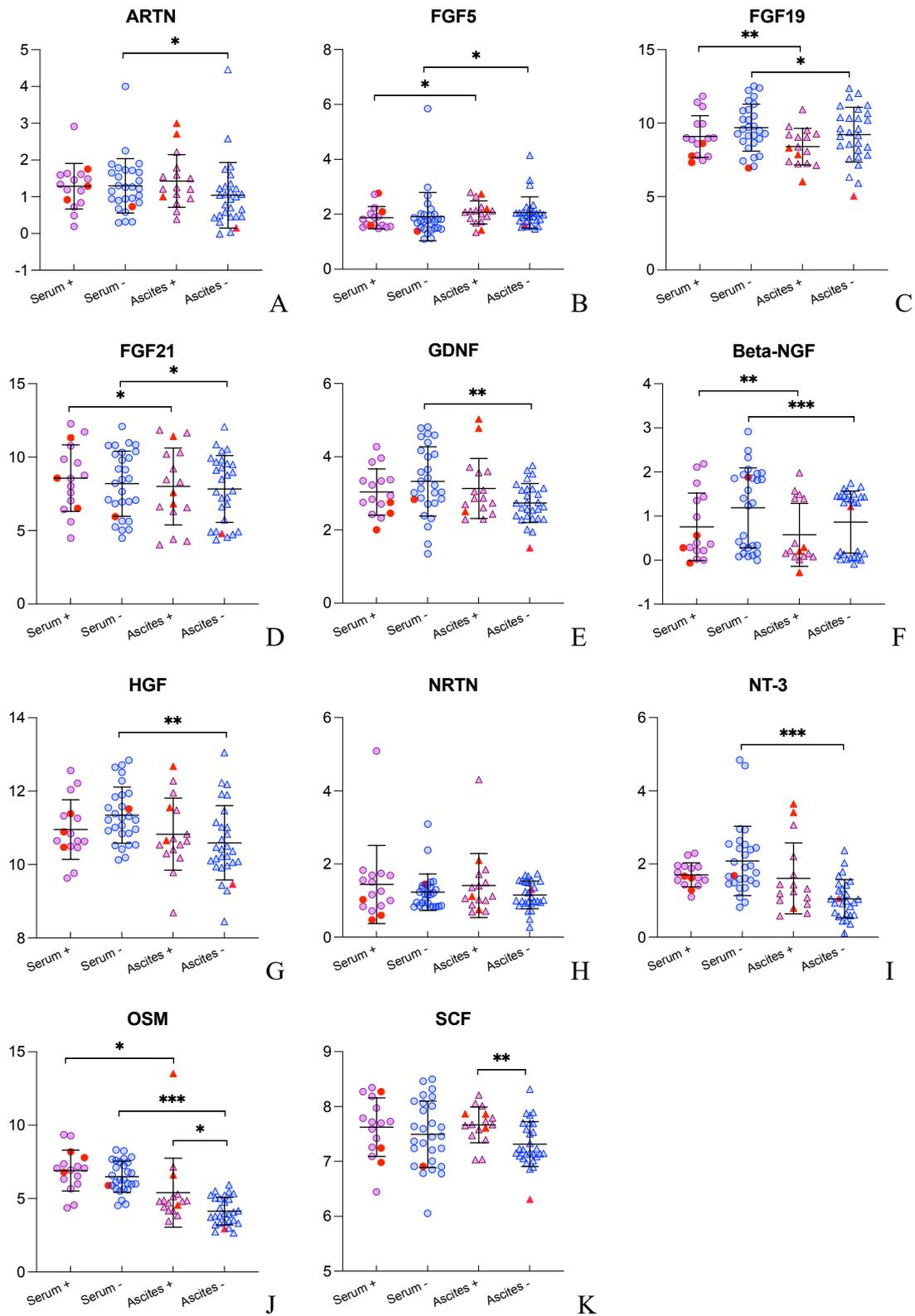
9 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1.1: CLIF-SOFA Score nach (Moreau et al., 2013). Fett gedruckte Werte markieren die Kriterien für ein Organversagen. | 8 |
| Tabelle 1.2: Der CLIF-C-OF Score | 9 |
| Tabelle 1.3: ACLV Grading nach der EF CLIF. | 9 |
| Tabelle 1.4: Der Child-Pugh-Score nach (Pugh et al., 1973) zur Evaluation der Organfunktion und Mortalitätsprognose bei Leberzirrhose | 11 |
| Tabelle 2.1: Übersicht aller evaluierten Proteine des Target 96 Inflammation Panel der Firma Olink® | 26 |
| Tabelle 3.1: Baseline Charakteristika aller Patient: innen | 33 |
| Tabelle 3.2: Grad der Erkrankung unserer Studienkohorte anhand gängiger Scoring-Systeme | 35 |
| Tabelle 3.3: Virusbefunde (n=22) nach Erregertypen in den Subgruppen (AD und ACLV) | 37 |
| Tabelle 3.4: Signalproteine und Enzyme (n=11) | 41 |
| Tabelle 3.5: Wachstumsfaktoren (n=15) | 44 |
| Tabelle 3.6: Zytokine (n=27) | 45 |
| Tabelle 3.7: Immunologische Rezeptoren (n=19) | 51 |
| Tabelle 3.8: Immunologische Rezeptoren (n=19) | 52 |
| Tabelle 3.9: Virusabhängig signifikante Biomarker (n=20) im Aszites mit $p < 0,05$. | 57 |
| Tabelle 3.10: Signifikante Biomarker im Serum mit $p < 0,05$ | 59 |
| Tabelle 3.11: Auftretens von Komplikationen in Abhängigkeit eines Virusbefundes | 59 |

10 TABELLARISCHER UND GRAFISCHER ANHANG

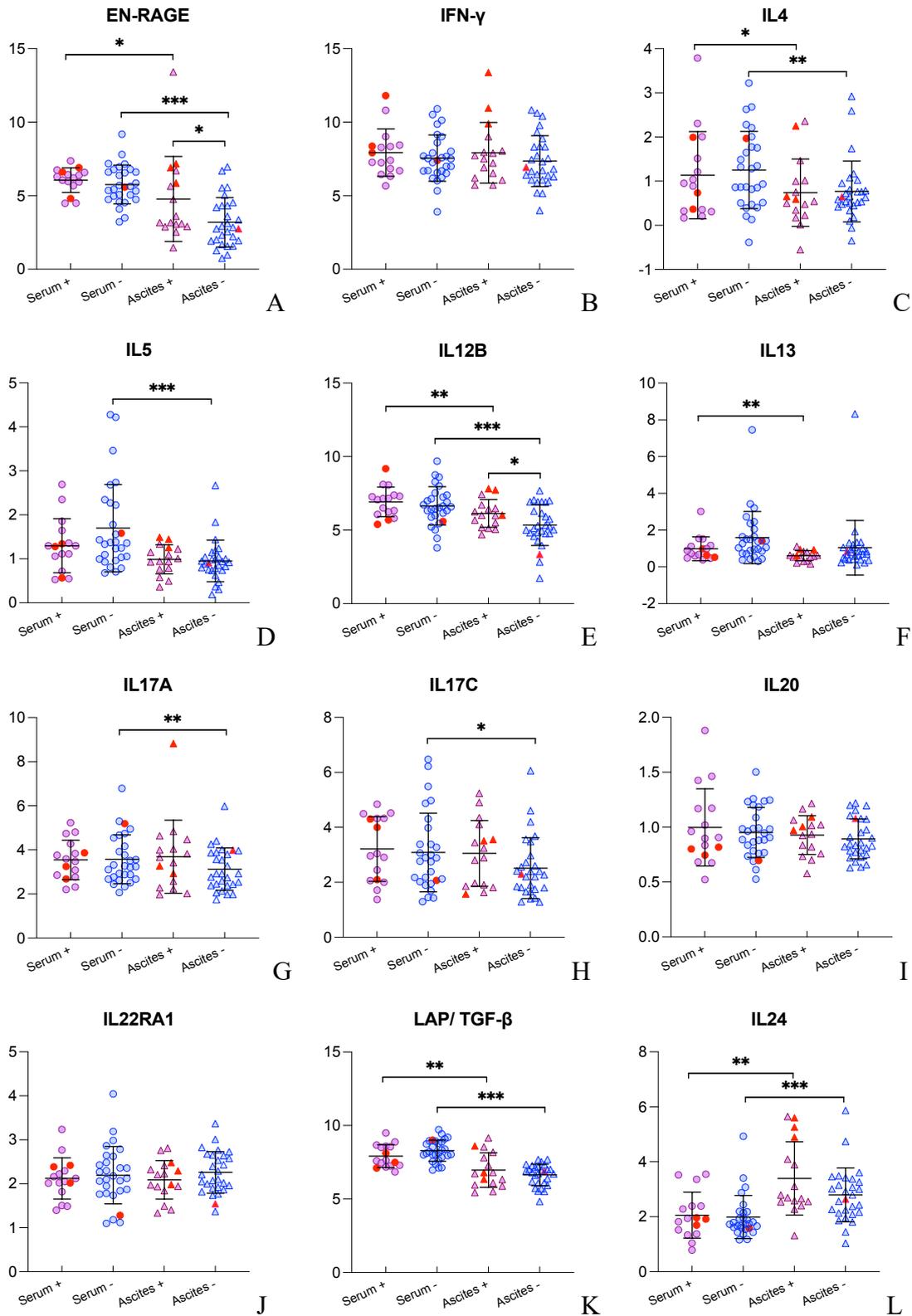


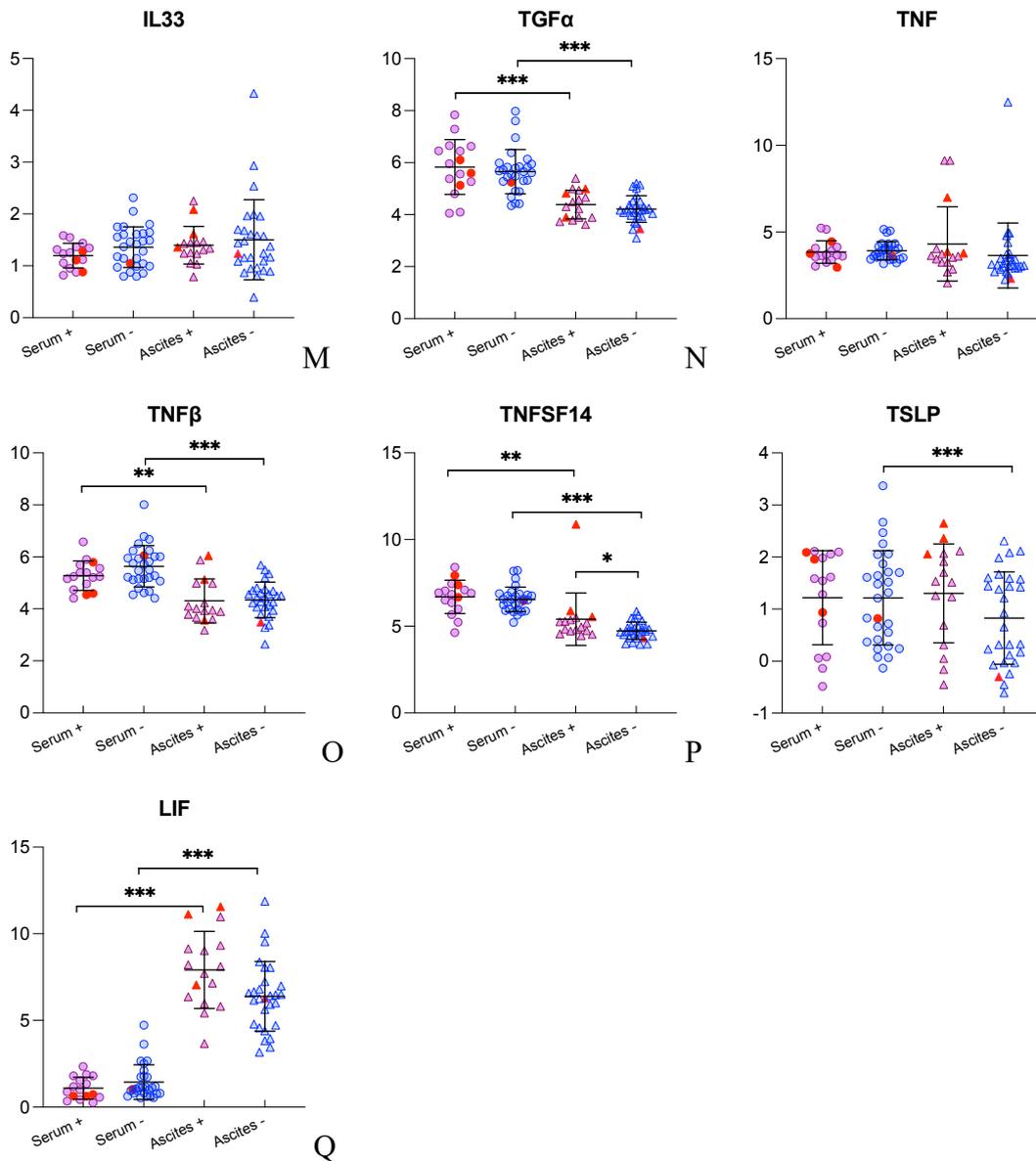
Abbildungen A-G: Evaluation wichtiger Signalproteine und Enzyme im Aszites und korrespondierender Serumproben von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n =16) und negativem (-, n =28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = p<0,05; ** = p<0,01; * = p<0,001.**



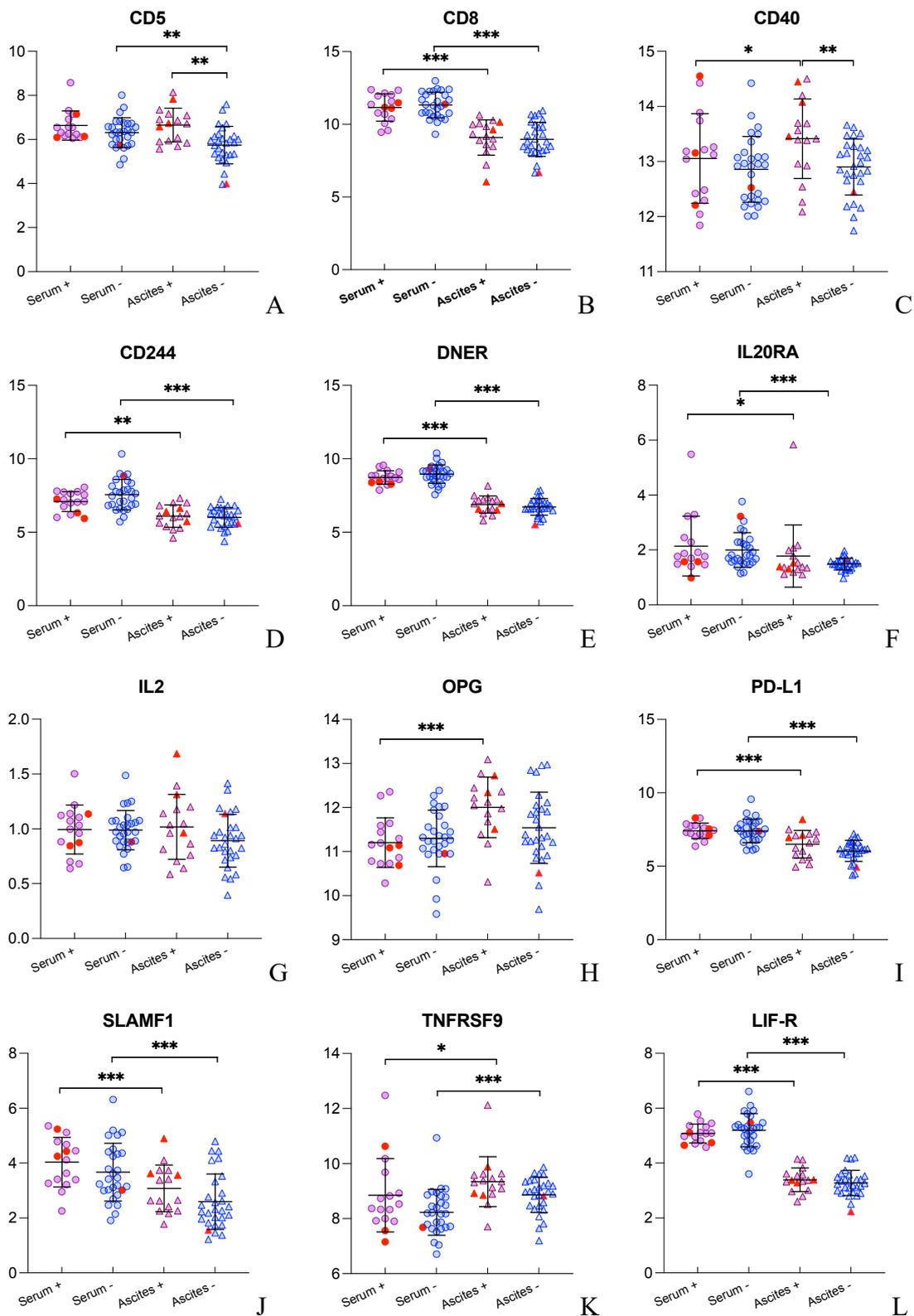
Abbildungen A-K: Evaluation und grafische Darstellung aller Wachstumsfaktoren im Aszites und korrespondierender Serumproben von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n=16) und negativem (-, n=28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung werden durch schwarze

Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.



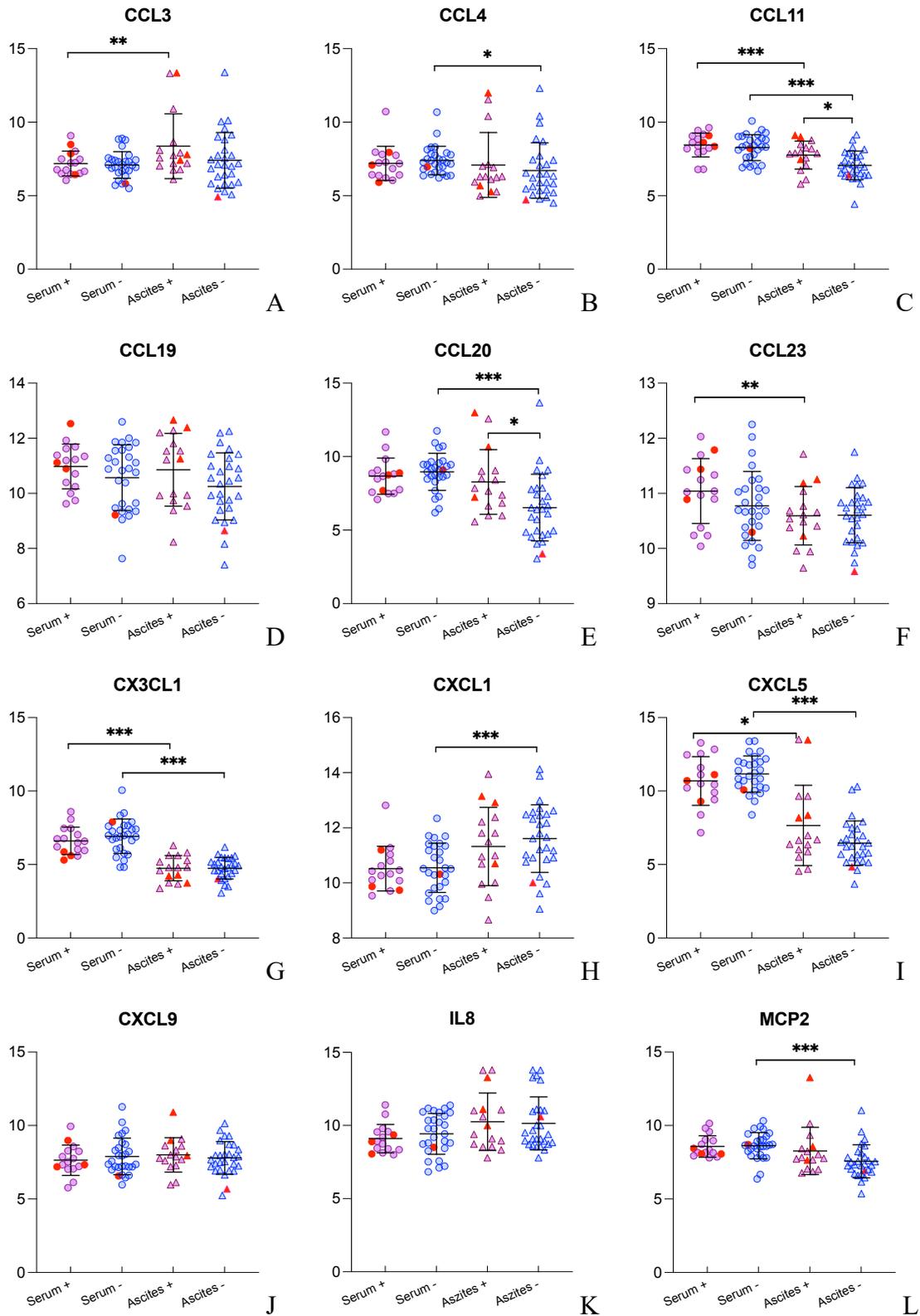


Abbildungen A-Q: Evaluation und grafische Darstellung aller Zytokine im Aszites und korrespondierender Serumproben von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n=16) und negativem (-, n=28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = p<0,05; ** = p<0,01; * = p<0,001.**



Abbildungen A-L: Evaluation und grafische Darstellung aller immunologischer Rezeptoren im Aszites und korrespondierender Serumproben von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n =16) und negativem (-, n =28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung werden

durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.



Abbildungen A-L: Evaluation und grafische Darstellung wichtiger Chemokine im Aszites und korrespondierender Serumproben von Leberzirrhosepatient:innen mit positivem (+, n =16) und negativem (-, n =28) Virusnachweis. Die Y-Achse präsentiert den NPX-Wert. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung werden durch schwarze Linien und Fehlerbalken markiert. Rote Items markieren vier Patient:innen mit diagnostizierter SBP. Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------------------------|--|
| ACLF | akut-auf-chronisches Leberversagen (acute-on-chronic liver failure) |
| ACLV | akut-auf-chronisches Leberversagen |
| AD | Akute Dekompensation |
| ALAT | Alanin-Aminotransferase |
| ALV | Akutes Leberversagen |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APASL | Asian Pacific Association for the Study of the Liver |
| ASAT | Aspartat-Aminotransferase |
| BMI | Body-Mass-Index |
| B19V | Parvovirus B19 |
| CAID | Zirrhose-assoziierte Immundysfunktion (cirrhosis associated immune dysfunction) |
| CARS | Kompensatorisches antiinflammatorisches Syndrom (Compensatory anti-inflammatory response syndrome) |
| CANONIC | Studie: CLIF Acute-on-Chronic Liver Failure in Cirrhosis |
| CI | Konfidenzintervall |
| CLIF | Chronic Liver Failure |
| CLIF-C | Chronic Liver Failure-Consortium |
| CLIF-C-OF Score | Chronic Liver Failure-Consortium-Organ-Failure Score |
| CLIF-C-AD Score | Chronic Liver Failure-Consortium-Acute-Dekompensation Score |
| CLIF-C-ACLF Score | Chronic Liver Failure-Consortium-Acute-on-chronic-Liver-Failure Score |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CT | Cycle threshold |
| DAMP | Schadensassoziierte Molekularstrukturen (damage-associated molecular pattern) |
| DRG | Diagnosebezogene Fallgruppen (Diagnosis Related Groups) |
| EASL | European Association for the Study of the Liver |
| EBV | Epstein-Barr Virus |
| ECMO | extrakorporale Membranoxygenierung |
| F_iO₂ | inspiratorische Sauerstoffkonzentration |
| GGT | γ -Glutamyltransferasen |
| GOT | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| GPT | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |
| H | Hämagglutinin |
| HBV | Hepatitis-B-Virus |
| hAdV | Humanes Adenovirus |
| hCMV | Humanes Cytomegalievirus |
| HE | Hepatische Enzephalopathie |

| | |
|----------------------------|---|
| HHV 3 | Varizella-Zoster Virus |
| HHV6 | Humanes Herpesvirus 6 |
| HHV7 | Humanes Herpesvirus 7 |
| HPeV | Humanes Parechovirus |
| HSV-1 | Herpes Simplex Virus 1 |
| HSV-2 | Herpes Simplex Virus 2 |
| IFN | Interferon |
| INR | International Normalized Ratio |
| KW | Kalenderwoche |
| MAD | mittlerer arterieller Druck |
| MELD | Model for End-Stage Liver Disease |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl |
| NACSELD | North American Consortium for the Study of End-Stage Liver Disease |
| NLRs | Nukleotid-Oligomerisierungsdomänen-ähnlichen Rezeptoren |
| OF | Organversagen (Organ Failure) |
| PAMP | Krankheitsassoziierte Molekularstrukturen (pathogen-associated molecular pattern) |
| paO₂ | arterieller Sauerstoffpartialdruck |
| PEA | Proximity Extension Assay |
| PMN | Polymorph-nukleär |
| PRR | pattern-recognition receptor |
| PTT | Partielle Thromboplastinzeit |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RLRs | Retinsäure-induzierbare Gen-I-ähnliche Rezeptoren |
| RSV | Respiratorisches Synzytial-Virus (respiratory syncytical virus) |
| SARS-CoV-2 | Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 |
| SBP | Spontan bakterielle Peritonitis |
| SIRS | Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (systemic inflammatory response syndrome) |
| STD | Standardabweichung |
| SOFA | Sequential Organ Failure Assessment |
| STIKO | Ständige Impfkommission |
| SVP | Spontan virale Peritonitis |
| TLRs | Toll-like-Rezeptoren |
| US | United States, Vereinigte Staaten von Amerika |
| WHO | World Health Organization |
| | |
| α | alpha |
| β | beta |
| γ | gamma |
| δ | delta |

12 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Lange danke ich für die geduldige und stets unterstützende Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Leitung zu erstellen.

Darüber hinaus möchte ich mich für das Mentoring und die Jahre der Zusammenarbeit an der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie am Universitätsklinikum Essen bedanken. Nicht nur mit seiner fachlichen Expertise, sondern insbesondere mit seiner menschlichen und wohlwollenden Führungsqualität ist mir Prof. Dr. Lange ein großes Vorbild in der universitären Medizin gewesen.

Außerdem möchte ich den Kolleginnen der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. Lange danken, allen voran Dr. rer. nat. Mona-May Langer für die unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung der Datensätze und Dr. phil. nat. Sabrina Guckenbiehl für die Betreuung der statistischen Auswertungen. Die Zusammenarbeit war in fachlicher und kollegialer Hinsicht stets eine große Bereicherung.

Schließen möchte ich mit meinem innigsten Dank an meine Eltern.

Ihr habt mir so viel Gutes mitgegeben. Eure Wurzeln sind meine Flügel.

13 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.